

Dissertação de Mestrado

BIODEGRADAÇÃO DE 2-METILNAFTALENO E FENANTRENO POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AP029-GLVIA NA PRESENÇA DE DISPERSANTE INDUSTRIAL EM MEIO AQUOSO

Francisco Bruno Ferreira de Freitas

Natal, Março de 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE TECNOLOGIA



DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**BIODEGRADAÇÃO DE 2-METILNAFTALENO E FENANTRENO POR
PSEUDOMONAS AERUGINOSA AP029-GLVIA NA PRESENÇA DE DISPERSANTE
INDUSTRIAL EM MEIO AQUOSO**

Francisco Bruno Ferreira de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Nathalia Saraiva Rios

Natal-RN

2024

Francisco Bruno Ferreira de Freitas

**BIODEGRADAÇÃO DE 2-METILNAFTALENO E FENANTRENO POR
PSEUDOMONAS AERUGINOSA AP029-GLVIA NA PRESENÇA DE DISPERSANTE
INDUSTRIAL EM MEIO AQUOSO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, sob a orientação do Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos e coorientação da Prof^a. Dr^a. Nathalia Saraiva Rios.

Natal-RN

2024

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Horácio Nicolas Solimo - - Engenharia Química
- EQ - CT

Freitas, Francisco Bruno Ferreira de.

Biodegradação de 2-metilnaftaleno e fenantreno por
pseudomonas aeruginosa AP029-glviia na presença de dispersante
industrial em meio aquoso / Francisco Bruno Ferreira de Freitas.
- Natal: UFRN, 2024.

87f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande
do Norte, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. Natal, RN, 2024.

Orientação: Everaldo Silvino dos Santos.

Coorientação: Nathalia Saraiva Rios.

1. Biodegradação - dissertação. 2. Fenantreno - dissertação.
3. 2-metil-naftaleno - dissertação. 4. Pseudomonas aeruginosa -
dissertação. 5. Biossurfactantes - dissertação. I. Santos,
Everaldo Silvino dos. II. Rios, Nathalia Saraiva. III. Título.

RN/UF/BSEQ

CDU 66.092

Elaborado por TIAGO LINCKA DE SOUSA - CRB-15/498

Francisco Bruno Ferreira de Freitas

**BIODEGRADAÇÃO DE 2-METILNAFTALENO E FENANTRENO POR
PSEUDOMONAS AERUGINOSA AP029-GLVIA NA PRESENÇA DE DISPERSANTE
INDUSTRIAL EM MEIO AQUOSO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, sob a orientação do Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos e coorientação da Prof^a. Dr^a. Nathalia Saraiva Rios.

Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos
Orientador - UFRN

Prof^a. Dr^a. Nathalia Saraiva Rios
Coorientadora – UFRN

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Araújo Padilha
Membro Interno - UFRN

Emilianny Rafaely Batista Magalhaes
Membro Externa – CETENE

Natal-RN

2024

RESUMO

O petróleo se destaca como um dos precursores para a produção de materiais, combustíveis e até medicamentos. Sabendo dessa grande importância, processos de extração e refino são frequentes e devido a essa grande exploração, acidentes podem acontecer causando derramamentos em solos e oceanos. Por apresentar alta carcinogenicidade e aspectos mutagênicos, a presença de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), presentes na composição do petróleo, representam riscos para humanos e animais selvagens. Assim, no sentido de mitigar os problemas ambientais causados pelos HPAs em caso de derramamento, o uso de microrganismos para a biodegradação tem sido visto como potencial solução. Um fator que dificulta a decomposição microbiológica dos HPAs, é a hidrofobicidade das moléculas, com isso a indústria investe no desenvolvimento de dispersantes que reduzem a tensão superficial na interface hidrocarboneto/água. Nesse contexto, a literatura vem demonstrando as vantagens dos biossurfactantes (surfactantes de origem biológica) em relação aos surfactantes da indústria química. O presente estudo tem como objetivo principal avaliar a capacidade de biodegradação de 2-Metilnaftaleno e Fenantreno (hidrocarbonetos modelos de HPA's) por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA na presença de biossurfactante industrial. O biossurfactante cedido pela empresa Syensqo Oil & Gas Solutions foi caracterizado em termos de tensão superficial e índice de emulsificação (E%). Ensaios de biodegradação foram realizados variando-se a concentração dos hidrocarbonetos e do biossurfactante, durante 10 dias, monitorando-se o pH, crescimento bacteriano e a taxa de biodegradação, sendo também avaliado a degradação da mistura dos hidrocarbonetos. Os resultados demonstram que o biossurfactante industrial apresentou resultados de índice de emulsificação satisfatórios para o tolueno e óleo lubrificante, apresentando valores acima de 40 % para concentrações de NaCl adicionadas e em pequenas concentrações de biossurfactante, após 240 horas de cultivo. O biossurfactante além de agir como um dispersante, diminuindo a tensão superficial da interface hidrocarboneto/água, atuou como uma fonte de carbono para o crescimento para a *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA, favorecendo assim o seu maior crescimento. A bactéria foi capaz de degradar o fenantreno (FEN) e o 2-Metilnaftaleno (2-MN) obtendo valores de degradação de até 61,43 %, e 97,22% respectivamente, dentro das mesmas condições, apresentando a concentração de 17,69 g/L de biossurfactante. Observou-se também que o biossurfactante melhorou a taxa de biodegradação, sendo para o fenantreno a única variável que apresentou influência significativa na resposta estudada, enquanto para o 2-MN o modelo apresentou que todas as variáveis e suas interações são significativas ao modelo proposto. Além disso, o modelo desenvolvido a partir dos resultados da análise estatística conseguiu explicar 92,31% dos dados apresentados para a degradação do fenantreno e cerca de 98,0% para a biodegradação do 2-MN. A mistura dos dois hidrocarbonetos modelos estudados, apresentou taxa de degradação de 11,12% e 82,95% para o fenantreno e o 2-MN respectivamente. Os resultados mostraram que a biodegradação dos HPAs por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA foi favorecida na presença do biossurfactante, tendo o 2-MN como hidrocarboneto de preferência.

Palavras-chaves: Biodegradação, fenantreno, 2-metil-naftaleno, *Pseudomonas aeruginosa*, biossurfactantes

ABSTRACT:

Oil stands out as one of the precursors for the production of materials, fuels and even medicines. Knowing this great importance, extraction and refining processes are frequent and due to this great exploration, accidents can happen causing spills in soils and oceans. Due to its high carcinogenicity and mutagenic aspects, the presence of some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), present in the composition of the oil, pose risks to humans and wild animals. Thus, in order to mitigate the environmental problems caused by PAHs in the event of a spill, the use of microorganisms for biodegradation has been seen as a potential solution. One factor that hinders the microbiological decomposition of PAHs is the hydrophobicity of the molecules, which is why the industry invests in the development of dispersants that reduce surface tension at the hydrocarbon/water interface. In this context, the literature has demonstrated the advantages of biosurfactants (surfactants of biological origin) in relation to surfactants from the chemical industry. The main objective of the present study is to evaluate the biodegradation capacity of 2-Methylnaphthalene and Phenanthrene (model hydrocarbons) by *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA in the presence of industrial biosurfactant using microcosm cultures. The biosurfactant provided by the company Syensqo Oil & Gas Solutions was characterized in terms of surface tension and emulsification index (E%). Biodegradation tests were carried out by varying the concentration of hydrocarbons and biosurfactant for 10 days, monitoring pH, bacterial growth and biodegradation rate, and also evaluating the degradation of the hydrocarbon mixture. The results demonstrate that the industrial biosurfactant presented satisfactory emulsification index results for toluene and lubricating oil, presenting values above 40% for concentrations of NaCl added and in small concentrations of biosurfactant, after 240 hours of cultivation. The biosurfactant, in addition to acting as a dispersant, reducing the surface tension of the hydrocarbon/water interface, acted as a carbon source for growth for *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA, thus favoring its greater growth. The bacteria was able to degrade phenanthrene (FEN) and 2-Methylnaphthalene (2-MN) obtaining degradation values of up to 61.43% and 97.22% respectively, within the same conditions, presenting a concentration of 17.69 g/L of biosurfactant. It was also observed that the biosurfactant improved the biodegradation rate, with phenanthrene being the only variable that had a significant influence on the studied response, while for 2-MN the model showed that all variables and their interactions are significant to the proposed model. Furthermore, the model developed from the results of the statistical analysis managed to explain 92.31% of the data presented for the degradation of phenanthrene and around 98.0% for the biodegradation of 2-MN. The mixture of the two model hydrocarbons studied presented a degradation rate of 11.12% and 82.95% for phenanthrene and 2-MN respectively. The results showed that the biodegradation of PAHs by *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA was favored in the presence of the biosurfactant, with 2-MN as the preferred hydrocarbon.

Key-words: Biodegradation, phenanthrene, 2-methyl-naphthalene, *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactants.

DEDICATÓRIA

Dedico a minha família, amigos e professores que sempre estiveram ao meu lado, cujo apoio, ânimo, paciência e orientação foram essenciais para superar os desafios e celebrar as conquistas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e as várias graças alcançadas no decorrer da caminhada.

Agradeço a toda a minha família, em especial a minha mãe Sandra e minha avó Maria por todo esforço e incentivo para que eu possa conquistar todos os meus sonhos. Amo vocês!

Agradeço sinceramente ao meu orientador, Everaldo Silvino e a minha coorientadora Nathalia Rios, pelas orientações sábias, paciência e apoio contínuo ao longo deste processo de pesquisa. Seus conhecimentos e dedicação foram fundamentais para o sucesso desta dissertação.

Agradeço em especial ao professor Carlos Padilha, por todos os momentos de ensinamento e nunca me deixar desistir em momentos difíceis, levo seus ensinamentos para a vida.

Aos meus amigos de graduação que ainda continuam comigo em todos os momentos que preciso: Glória Louine, Gleyson Batista e José Valderisso. Obrigado por sempre estarem comigo em todo e qualquer momento. Amo vocês!

Agradeço aos meus amigos e colegas que conquistei durante o mestrado, em especial a Isabela Oliveira, Myllena Kely, Elano Costa, Beatriz Meneghetti, Jaqueline Siqueira, Marcos Paulo, Lucas Antônio, Herbet Lima, Thalita Medeiros e Renata Cibely, que compartilharam este percurso comigo. Suas contribuições, momentos de risada e amizade tornaram esta jornada mais rica e significativa.

Agradeço em especial a Geovane Santiago e Deyvison Soares, por estarem ao meu lado na reta final desse desafio e sempre me presentarem com forças e incentivos. Agradeço sinceramente por serem uma parte valiosa deste percurso acadêmico.

Aos demais amigos e amigas que conheci do curso de engenharia química e o curso de mestrado, que direta ou indiretamente contribuíram nessa caminhada.

Aos colegas e amigos do laboratório em engenharia bioquímica, LEB, pelos grandes ensinamentos, a amizade e orientação recebida durante toda a jornada.

Aos amigos que deixei na Paraíba, Alfredina Araujo, Maria do Socorro, Amanda Rodrigues, Wesleyana Firme, Thalison Gustavo, Victória Cristina, Kenia Alves, Yanara Gomes, Astrid Lopes, Eryck Allan, meu muito obrigado por mesmo de longe estarem ao meu lado e me auxiliarem sempre.

Aos professores do PPGEQ pelos ensinamentos e conhecimentos indispensáveis para minha construção profissional e pessoal.

Aos examinadores pela contribuição.

À Petrobras e a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) pelo apoio financeiro através do seu Programa de Recursos Humanos PRH-44.1 com a concessão de bolsa.

Agradeço à Syensqo Oil and Gas Solutions pela parceria, em especial a Ana Tereza de Barros e Thaís Destefani pelo suporte.

A todos que contribuíram para este trabalho, torceram e torcem por mim, e me apoiam em todos os momentos da minha vida, meu MUITO OBRIGADO.

"A educação é um ato de amor, e, por isso, um ato de coragem." - Paulo Freire

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	0
1. Introdução	1
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	4
2. Objetivos.....	5
2.1. Objetivo Geral	5
2.2. Objetivos Específicos.....	5
CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3. Revisão Bibliográfica	7
3.1. Petróleo e seus derivados	7
3.2. Hidrocarbonetos de petróleo.....	8
3.2.1. 2-Metilnaftaleno	8
3.2.2. Fenantreno.....	9
3.3. Impactos ambientais gerados pelo derramamento de hidrocarbonetos de petróleo em ambiente marinho	10
3.5. Biossurfactantes	13
CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS	16
4. Materiais e Métodos	17
4.1. Materiais e equipamentos	17
4.2. Métodos	18
4.2.1. Microrganismo.....	18
4.2.2. Biossurfactante industrial.....	18
4.2.3. Experimentos de biodegradação.....	19
4.2.4. Biodegradação da mistura dos hidrocarbonetos.....	22
4.2.5. Análise estatística	23
CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
5. Resultados e Discussões.....	25
5.1.1. Índice de Emulsificação do biossurfactante industrial	25
5.1.2. Tensão superficial (mN/m).....	28
5.2. Degradação dos hidrocarbonetos de petróleo.....	29
5.2.1. pH	29
5.2.2. Crescimento bacteriano da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AP029-GLVIA	30
5.2.3. Taxa de Biodegradação dos hidrocarbonetos	35
5.3. Degradação da mistura dos hidrocarbonetos de petróleo	47
CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES.....	49
6. Conclusões	50
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

7. Referências Bibliográficas	53
APÊNDICE	67
APÊNDICE I	68
APÊNDICE II	69
APÊNDICE III	70
APÊNDICE IV	71
APÊNDICE V	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1 - Estrutura molecular do 2-MN.....	8
Figura 3. 2 - Estrutura molecular do Fenantreno.....	9
Figura 4. 1 - Montagem do experimento.....	19
Figura 5. 1 - Índice de emulsificação determinado em diferentes instantes: 24, 72, 120 e 240 horas para o n-Hexadecano em diferentes concentrações salinas: a) 0% de NaCl, b) 2,0% de NaCl, c) 3,5% de NaCl e d) 5,0% de NaCl.....	25
Figura 5. 2 - Índice de emulsificação determinado em diferentes instantes: 24, 72, 120 e 240 horas para o tolueno em diferentes concentrações salinas: a) 0% de NaCl, b) 2,0% de NaCl, c) 3,5% de NaCl e d) 5,0% de NaCl.	26
Figura 5. 3 - Índice de emulsificação determinado em diferentes instantes: 24, 72, 120 e 240 horas para o óleo mineral lubrificante em diferentes concentrações salinas: a) 0% de NaCl, b) 2,0% de NaCl, c) 3,5% de NaCl e d) 5,0% de NaCl.	27
Figura 5. 4 - Tensão superficial do biossurfactante industrial em diferentes concentrações. .	29
Figura 5. 5 - Valores de crescimento da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AP029-GLVIA para os 11 experimentos durante os 10 dias de degradação do fenantreno na presença do biossurfactante.	31
Figura 5. 6 - Valores de crescimento da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AP029-GLVIA para as 5 concentrações de fenantreno estudadas sem a adição do biossurfactante, durante os 10 dias de degradação.	32
Figura 5. 7 - Valores de crescimento da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AP029-GLVIA para os 11 experimentos durante os 10 dias de degradação do 2-MN na presença do biossurfactante.	34
Figura 5. 8 - Valores de crescimento da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AP029-GLVIA para as 5 concentrações do 2-MN estudadas sem a adição do biossurfactante, durante os 10 dias de degradação.	35
Figura 5. 9 - Taxa de Biodegradação do fenantreno para os 11 experimentos durante os 10 dias de degradação na presença do biossurfactante.	36
Figura 5. 10 - Superfície de resposta para a taxa de biodegradação do fenantreno em função das variáveis concentração de fenantreno e concentração de biossurfactante.....	39
Figura 5. 11 - Curvas de contorno para a taxa de biodegradação do fenantreno em função das variáveis concentração de fenantreno e concentração de biossurfactante.	40
Figura 5. 12 - Taxa de biodegradação para as 5 concentrações de fenantreno estudadas sem a adição do biossurfactante, durante os 10 dias de degradação.....	40

Figura 5. 13 - Taxa de Biodegradação do 2-MN para os 11 experimentos durante os 10 dias de degradação na presença do biossurfactante.	41
Figura 5. 14 - Superfície de resposta para a taxa de biodegradação do 2-MN em função das variáveis concentração de 2-MN e concentração de biossurfactante.	44
Figura 5. 15 - Curvas de contorno para a taxa de biodegradação do 2-MN em função das variáveis concentração de 2-MN e concentração de biossurfactante	45
Figura 5. 16 - Taxa de biodegradação para as 5 concentrações do 2-MN estudadas sem a adição do biossurfactante, durante os 10 dias de degradação.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 4. 1 - Matriz do planejamento CCR para avaliar o efeito da concentração do fenantreno e do biossurfactante industrial na taxa de biodegradação do hidrocarboneto	20
Tabela 4. 2 - Matriz do planejamento CCR para avaliar o efeito da concentração do 2-MN e do biossurfactante industrial na taxa de biodegradação do hidrocarboneto	21
Tabela 5. 1 - Resultados da taxa de biodegradação do fenantreno, em condições experimentais de acordo com a matriz do planejamento composto central.....	37
Tabela 5. 2 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial para a degradação do fenantreno.	38
Tabela 5. 3 - Resultados da taxa de biodegradação do 2-MN, em condições experimentais de acordo com a matriz do planejamento composto central.	42
Tabela 5. 4 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial para a degradação do 2-MN.....	43
Tabela 5. 5 - Resultados das análises da degradação da mistura dos hidrocarbonetos de petróleo	47

LISTA DE SIGLAS

2-MN: 2-MetilNaftaleno

ACN: Acetonitrila

ANP: Agência Nacional de Petróleo

ATSDR: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

CCR: Planejamento Composto Central

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMC: Concentração micelar crítica

FEN: Fenantreno

HPAs: Hidrocarboneto Policíclico Aromático

HSDB: *Hazardous Substances Data Bank*

IE: Índice de Emulsificação

LEB: Laboratório de Engenharia Bioquímica

NUPEG: Núcleo de Ensino e Pesquisa de Petróleo e Gás

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1. Introdução

O petróleo é uma matéria-prima não renovável, porém essencial para a sociedade. Ele e seus petroderivados estão presentes em combustíveis, na formulação de plásticos, cosméticos, borrachas, fibras, asfalto e até de alguns medicamentos, essa necessidade é a responsável pela forte atividade de extração e refino o que eventualmente causa derramamentos em solos e oceanos ao redor de todo o planeta (Geraldo & Maranhão, 2020). A contaminação gerada por derramamentos de petróleo causa sérios problemas ambientais (Gallotta & Christensen, 2012).

Em áreas afetadas pela poluição crônica e/ou aguda por óleo, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) são contaminantes de grande preocupação, pois são tóxicos, ubíquos, capazes de se bioacumular e apresentam potencial para desencadear efeitos carcinogênicos (Achten & Andersson, 2015; Neff, 2002; Ohiozebau *et al.*, 2017).

O 2-metilnaftaleno (2-MN) pertence a classe dos HPAs, sendo o componente mais tóxico à fração solúvel em água de óleos brutos e tem sido encontrado em altas concentrações na água através de estudos em organismos marinhos vertebrados e invertebrados. De acordo com Honda *et al.*, 1990, a exposição ao 2-MN causa uma diminuição na concentração de hemoglobina, inibição do consumo de oxigênio e danos pulmonares em vários animais que foram submetidos ao composto. Já o fenantreno (FEN) é um hidrocarboneto aromático polinuclear, cristalino, isômero do antraceno, obtido principalmente da fração de óleo de antraceno do alcatrão de hulha e sinteticamente. O FEN pertence à classe dos compostos orgânicos semivoláteis, formado por anéis benzênicos ligados de forma linear, angular ou agrupados, contendo somente carbono e hidrogênio (Lundstedt, 2003). O fenantreno é considerado um poluente potencial devido à sua toxicidade, persistência e predominância no meio ambiente (U.S. EPA, 2008). A remoção efetiva de HPAs do ambiente é extremamente importante e tem atraído ampla atenção de pesquisadores (Al-Zahrani *et al.*, 2022).

Portanto, determinar como remover HPAs de águas contaminadas é uma preocupação urgente (Médic *et al.*, 2020; Huang, *et al.*, 2023; Ferraro *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2022, Logeshwaran *et al.*, 2022). Vários métodos de base química, física e biológica foram desenvolvidos e estão atualmente disponíveis para a remediação de águas contaminadas com HPAs (Sun *et al.*, 2021). Dentre as quais, a biorremediação vem ganhando atenção devido às desvantagens do método de base química ou física, incluindo alto custo, consumo de energia e geração de subprodutos (Bianco *et al.*, 2022a; 2022b).

A biodegradação de compostos de petróleo em ambientes marinhos é majoritariamente baseada na capacidade dos microrganismos de degradar compostos de petróleo. Os

microrganismos mais comuns são as bactérias e muitos gêneros diferentes foram identificados sendo capazes de degradar os hidrocarbonetos do petróleo, por exemplo: *Enterobacter* sp (Prartono *et al.*, 2022), *Pseudomonas* (Benchouk & Chibani, 2017; Efeovbokhan *et al.*, 2014; Mehrdad *et al.*, 2019), *Rhodococcus* (Hackbusch *et al.*, 2020). Têm sido demonstrado que a tecnologia de biorremediação tem sido utilizada por consideráveis grupos de pesquisa em todo o mundo, utilizando *Pseudomonas* sp como potencial biodegradador para remover poluentes de sítio(s) contaminado(s) (Varjani & Upasani, 2021).

Várias espécies de *Pseudomonas* têm sido relatadas como responsáveis por degradar hidrocarbonetos com vários comprimentos de cadeia e estruturas (Van Beilen *et al.*, 2001; Chebbi *et al.*, 2017; Grifoll *et al.*, 1994; Resnick & Gibson, 1996; e Zhang *et al.*, 2011). Sendo capaz de utilizar um amplo espectro de hidrocarbonetos, o gênero *Pseudomonas* tem um papel fundamental na remoção desses compostos de locais poluídos por petróleo (Varjani, 2017). Isso é particularmente importante porque os extremófilos degradadores de hidrocarbonetos podem tolerar uma ampla gama de condições e podem ser usados para biorremediação de habitats extremos poluídos (Margesin & Schinner, 2001; Mehetre *et al.*, 2019).

Cada componente do petróleo tem um comportamento químico característico que influencia a sua biodegradabilidade. As taxas de degradação dos HPAs por microrganismos seguem a seguinte ordem decrescente de susceptibilidade: n-alcenos > alcanos ramificados > aromáticos de baixa massa molecular > alcanos cíclicos. Portanto, compostos cíclicos como o 2-MN e o FEN possuem maior dificuldade de degradação e persistem no ambiente por mais tempo (Al- Hawash *et al.*, 2018).

Outro fator que dificulta a decomposição microbiológica de óleos e derivados é a hidrofobicidade das moléculas de hidrocarbonetos. Isso leva à sua sorção em diferentes superfícies e transição para uma forma biologicamente de difícil acesso, devido à sua alta tensão interfacial e baixa solubilidade em água, o que dificulta sua remediação no local contaminado (Ayangbenro & Babalola 2017; Bhati *et al.* 2019; Kapoor *et al.* 2019), bem como a falha no contato efetivo com as células microbianas, que geralmente possuem uma camada externa hidrofílica (Korshunova *et al.* 2019).

Os dispersantes são projetados para aumentar a dispersão natural, reduzindo a tensão superficial na interface hidrocarboneto/água, facilitando a movimentação e gerando mais gotículas pequenas (Brakstade *et al.*, 2015). Neste contexto, a literatura vem demonstrando as vantagens dos biossurfactantes (surfactantes de origem biológica) em relação aos surfactantes de origem química, incluindo menor toxicidade, maior biodegradabilidade e possíveis atividades biológicas (Banat *et al.*, 2010; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011). Os biossurfactantes

são um grupo estruturalmente diverso de compostos produzidos por organismos que possuem propriedades tensoativas e ação emulsificante. As propriedades dos biossurfactantes são semelhantes às do surfactante; eles têm aplicações industriais em relação à detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade de formação de espuma, solubilidade, fases de dispersão (Banat *et al.*, 2010, Nitschke & Pastore, 2002). Além disso, destaca-se suas aplicações na área de catálise eletrônica usando microestruturas (Rehman *et al.*, 2010).

Até agora não existem estudos consistentes que investiguem a interação entre biossurfactantes industriais e cepas de *Pseudomonas aeruginosa* na biodegradação de HPAs. O uso de biossurfactantes externos aos produzidos pela própria bactéria é de extrema importância, tendo em vista que o biossurfactante se trata de um composto biológico que não causa danos químicos ao ambiente que foi adicionado. Outro fator de importância da adição de biossurfactantes externos se refere a baixa produção de biossurfactantes do microrganismo adicionado para a degradação.

Neste sentido, esta dissertação aborda ensaios realizados para avaliar a influência de dispersantes na degradação de HPAs modelo (2-Metilnaftaleno e Fenantreno) por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA. O presente trabalho encontra-se dividido em sete capítulos, iniciando incluindo a Introdução no Capítulo 1 **Introdução**. No capítulo 2 são apresentados os **Objetivos** propostos, seguido do capítulo 3, onde foi apresentada a **Revisão Bibliográfica** com ênfase no derramamento de petróleo e seus hidrocarbonetos e quais as principais rotas para a sua degradação. O Capítulo 4, descreve os **Materiais e Métodos** empregados ao longo da pesquisa, ao passo que os resultados são apresentados e discutidos no Capítulo 5, **Resultados e Discussão**. O Capítulo 6 aponta as principais **Conclusões** do estudo, o qual é finalizado pelo Capítulo 7 onde são apresentadas as **Referências Bibliográficas**, fonte de consulta para o desenvolvimento do trabalho de pesquisa.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de biodegradação de 2-MN e FEN (hidrocarbonetos modelos) na presença de biossurfactante industrial (dispersante) por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar as propriedades do biossurfactante industrial em termos da tensão superficial e do índice de emulsificação.
- Realizar ensaios da biodegradação dos hidrocarbonetos modelos (2-Metil-Naftaleno e Fenantreno) na presença de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*;
- Acompanhar a biodegradação dos compostos modelos, durante dez dias, através das análises físico-químicas (pH e crescimento bacteriano).
- Investigar os efeitos de concentração de HPA (2-MN ou FEN) e biossurfactante sobre o índice de degradação do HPA por *P.aeruginosa*.
- Avaliar o desempenho da biodegradação dos hidrocarbonetos modelos na ausência de biossurfactante;
- Realizar a biodegradação da mistura dos hidrocarbonetos em condições otimizadas, avaliando a capacidade da cepa em degradar misturas de hidrocarbonetos.

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Petróleo e seus derivados

O petróleo é originado a partir de matéria orgânica resultante de restos de animais depositados nos sedimentos que, ao longo do tempo, passaram por reações químicas, bacteriológicas, pressão das camadas sobrepostas e calor. Os dados geológicos da matéria orgânica das bacias sedimentares e caracterização das rochas formadoras são analisados quanto à presença do petróleo. A partir das análises do local, o local de perfuração é escolhido para extração (Gonzáles, 2012; Lima, 2003).

Segundo a ANP (2022), as produções anuais médias de petróleo e de gás natural do Brasil foram recordes. A extração de petróleo alcançou a marca de 3,021 mil barris/dia (Mbbl/d), 2,47% maior do que o recorde registrado no ano de 2020 (2,948 mil barris/dia Mbbl/d). Em dezembro do mesmo ano, a produção do pré-sal correspondeu a 2,986 milhões de barris equivalentes de petróleo (boe), representando 75,5% do total da produção nacional, caracterizando um aumento de 10,2% em comparação com o mesmo mês do ano anterior. Os campos marítimos foram responsáveis por 97,6% dessa produção e os campos operados pela Petrobras, sozinha ou em consórcio com outras empresas, corresponderam a 91,15% do total extraído (ANP, 2022).

O petróleo é composto de uma variedade de hidrocarbonetos, compostos de carbono (83% – 87%), hidrogênio (11% – 14%) e enxofre (0,06% – 0,8%), nitrogênio (0,02% – 1,7%), oxigênio (0,08% – 1,82 %) e componentes de metais residuais (níquel, vanádio, ferro, antimônio entre outros) (Aguelmous *et al.*, 2020). Os hidrocarbonetos formados pela combinação de carbono e hidrogênio constituem o principal componente do petróleo, representando cerca de 95% a 99%. Vários hidrocarbonetos são classificados de acordo com sua estrutura: alcanos, cicloalcanos e hidrocarbonetos aromáticos.

Após extração, para que o petróleo tenha seu potencial energético inteiramente aproveitado é necessário que seja fracionado através de coluna de destilação, além de outras operações unitárias. Neste processo, o petróleo cru é transformado obtendo-se desta forma a maior quantidade possível de produtos com alto valor agregado com redução daqueles de menor valor comercial (Bueno, 2003). Posteriormente, o óleo cru é fracionado em produtos mais refinados, como o gás liquefeito de petróleo, gasolina, querosene iluminante, querosene de aviação, óleo diesel, óleos combustíveis, óleos lubrificantes e matérias-primas para a indústria petroquímica (Hamza, 2012).

Os alcanos são os principais componentes da gasolina, diesel e combustível de aviação (Schirmer *et al.*, 2010). A estrutura molecular pode ser linear, ramificada ou cíclica. A fórmula geral dos alcanos lineares é C_nH_{2n+2} , a fórmula geral dos alcanos ramificados é C_nH_{2n+2} ($n > 2$) e a fórmula geral dos cicloalcanos é C_nH_{2n} ($n > 3$). Aromáticos são encontrados na gasolina, diesel, lubrificantes, querosene, alcatrão e asfalto (Zakaria *et al.*, 2018). Eles têm uma estrutura molecular semelhante aos cicloalcanos, mas possuem pelo menos um anel benzênico (Sadeghbeigi, 2012). Os aromáticos têm a fórmula geral C_nH_{2n-6} .

O petróleo é derivado do betume, e as moléculas mais pesadas e polares do asfalto são firmemente adsorvidas na rocha geradora, tornando problemática a descarga no reservatório. Como resultado, os mais frequentes são os hidrocarbonetos saturados com a menor polaridade, seguidos pelos aromáticos (Tissot & Welte, 1984). A massa molecular dos hidrocarbonetos influencia a sua degradabilidade. Os hidrocarbonetos de baixa massa molecular têm melhor biodisponibilidade do que os hidrocarbonetos de alta massa molecular (Vasconcelos *et al.*, 2011).

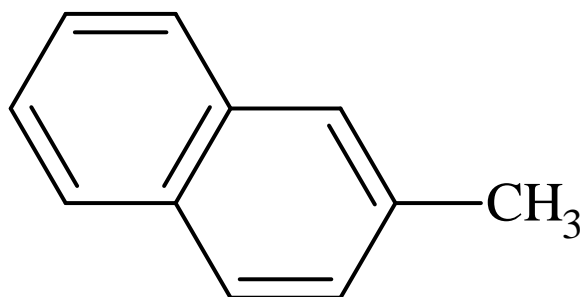
Como resultado, a suscetibilidade dos hidrocarbonetos à degradação microbiana é geralmente: alcanos lineares > alcanos ramificados > aromáticos com baixa massa molecular > alcanos cíclicos (Imam *et al.*, 2019).

3.2. Hidrocarbonetos de petróleo

3.2.1. 2-Metilnaftaleno

O 2-MN (Figura 3.1) é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA), que consiste em dois anéis aromáticos fundidos com um grupo metil ligado a um dos anéis no carbono número dois (ATSDR, 2009; CRC, 1990). É um componente natural do petróleo bruto e do carvão, sendo encontrado na pirólise e em produtos de combustão, como fumaça de cigarro, madeira, emissões de motores de combustão, asfalto, resíduos de alcatrão de hulha e óleos usados (ATSDR, 2009; HSDB, 2002; Warshawsky, 2001).

Figura 3.1 - Estrutura molecular do 2-MN



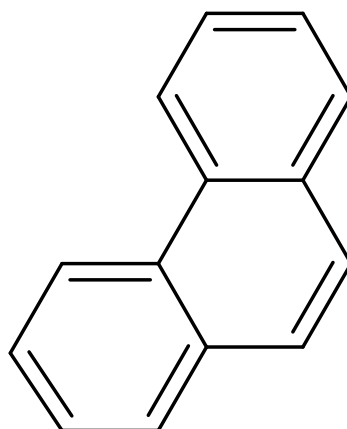
Fonte: Autoria Própria (2024)

O Metilnaftaleno é uma mistura de aproximadamente dois terços de 2-metilnaftaleno e um terço de 1-metilnaftaleno. O metilnaftaleno é fabricado a partir do alcatrão de hulha por meio da extração de heteroaromáticos e fenóis. A destilação do metilnaftaleno remove o 1-metilnaftaleno, deixando o 2-metilnaftaleno. Misturas contendo 2-metilnaftaleno são usadas na formulação de alquil-naftaleno sulfonatos (usados para detergentes e agentes umectantes têxteis), naftalenos clorados e hidronaftalenos (usados como solventes). O 2-metilnaftaleno puro é um componente utilizado na fabricação da vitamina K e do inseticida 1-naftil-N-metilcarbamato (HSDB, 2002).

3.2.2. Fenantreno

O fenantreno (Figura 3.2) ($C_{14}H_{10}$) pertence à classe dos HPAs de baixa massa molecular (178,23 g/mol), formado por três anéis aromáticos fundidos e possui baixa solubilidade em água (1,1 mg/L). Em comparação com o seu isômero antraceno, que apresenta uma configuração linear, o fenantreno apresenta um dos anéis não linearmente arranjado em relação aos demais. O fenantreno em temperatura ambiente, é encontrado na forma de um sólido esbranquiçado (Costa Filho, 2018; Souza, 2016). O fenantreno está na lista dos poluentes prioritários classificado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA), possuindo efeitos tóxicos e mutagênicos (CETESB, 2016).

Figura 3. 2 - Estrutura molecular do Fenantreno



Fonte: Autoria Própria, 2024

O fenantreno é um dos HPAs mais utilizados como modelo de estudo para avaliar o potencial biorremediador do diesel pelos microrganismos. Pode ser utilizado como única fonte de carbono na presença de oxigênio por alguns gêneros de bactérias heterotróficas (Peng *et al.*, 2008), é menos tóxico que outros HPAs, o que está associado a maior solubilidade, tornando seu uso possível em laboratório (Di Toro *et al.*, 2007).

Além disso, permite o acompanhamento qualitativo do processo, pois ao ser biodegradado gera um subproduto denominado 2-hidroxi-mucônico-semialdeído, facilmente identificável por sua coloração amarela no meio de cultura (Granscheuch *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019). Além do exposto, já foi relatado que microrganismos capazes de biodegradar o fenantreno também podem degradar outros HPAs como antraceno, naftaleno e benzo[a]pireno (Fernández-Luqueño *et al.*, 2011). Devido a isso, o fenantreno é considerado representativo em estudos para determinar a capacidade de biodegradação de compostos aromáticos policíclicos (Cao *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2014).

3.3. Impactos ambientais gerados pelo derramamento de hidrocarbonetos de petróleo em ambiente marinho

A descarga de hidrocarbonetos líquidos de petróleo nos mares, oceanos e costas por atividades antropogênicas resulta em um dano profundo no ecossistema marinho e na saúde humana. Esses derramamentos contaminam fontes de água, prejudicam a vida marinha, ameaçam a saúde pública e prejudicam a economia (EPA, 1993).

Ao ser lançado no mar, quanto maior é o tempo de exposição do petróleo a fenômenos do intemperismo, maior é o dano causado ao ambiente e mais difícil de ser recuperado (Rainha *et al.*, 2017). Os derramamentos podem ocorrer nas diversas partes da indústria do petróleo: durante as atividades de exploração e produção nas plataformas e poços *offshore* e durante o transporte de petróleo por navios petroleiros e oleodutos. Derramamentos de óleo durante seu transporte por petroleiros ou oleodutos são a maior e mais comum fonte de derramamentos de óleo (Schmidt-Etkin, 2011). A Federação Internacional de Poluição de Proprietários de Petroleiros (ITOPF) classificou os derramamentos de óleo por dimensão, sendo classificado em três grupos: pequeno (<7 toneladas ou 50 bbls), médio (7 a 700 toneladas ou 50 a 5.000 bbls) e grande (> 700 toneladas ou 50.000 bbls) (ITOPF, 2016). As técnicas de resposta e prevenção de derramamento de óleo ajudam a diminuir as possíveis consequências ambientais de vários cenários de derramamento de óleo.

Acidentes envolvendo derramamentos de hidrocarbonetos de petróleo ocorrem com frequência em todo o mundo e, mesmo que a característica mais marcante de um derramamento de óleo no ecossistema marinho seja a mancha superficial de petróleo bruto, a fração solúvel em água do petróleo é responsável pela indução de efeitos tóxicos graves em diferentes níveis celulares e moleculares (Medeiros *et al.*, 2017; Pasquevitch *et al.*, 2013). Foi reportado que alguns componentes de derramamentos de óleo oxigenado, como conteúdos aromáticos, ácidos e álcoois, podem exercer toxicidade em uma variedade de alvos, causando também poluição crônica do ambiente aquático (Bayat *et al.*, 2005).

Os HPAs são classificados como poluentes orgânicos persistentes por serem tóxicos, persistentes, bioacumulativos, transportados por longas distâncias pelo ar, podendo contaminar os alimentos e se acumular na cadeia alimentar, fenômeno chamado de biomagnificação, que acaba tendo efeitos negativos na saúde e no meio ambiente. O acúmulo de HPA pode ocorrer no fígado (em peixes), no hepatopâncreas ou na glândula digestiva (em crustáceos, anelídeos e moluscos) e em vários órgãos (começando pelo fígado em mamíferos). A absorção dos HPAs está intimamente relacionada às suas propriedades lipofílicas, e essa característica pode levar a uma alteração na estrutura da membrana e interferência no funcionamento celular, o que revela o caráter mutagênico desse composto. Para exercer esse efeito, a substância precisa ser ativada pelo metabolismo, pois ao passar pelo mecanismo de biotransformação, esses compostos tornam-se eletrofilicos e mais reativos, aumentando a possibilidade de associação e danos a substratos endógenos como proteínas, membranas e material genético (Garcia *et al.*, 2014).

O efeito dos derrames de hidrocarbonetos, tanto crônicos como súbitos, nas aves marinhas, mamíferos aquáticos, invertebrados e peixes é bastante grave e traumático, resultando em mortalidade. As aves marinhas são afetadas pela ingestão de óleo, enquanto o contato com o óleo prejudica seu voo (White *et al.*, 2017). A assimilação ou inalação dos hidrocarbonetos afeta drasticamente a saúde da vida marinha, causando inflamação dos tratos digestivos, danos nos rins e no fígado. (Krishnamoorthy *et al.*, 2017). Assim, a exposição crônica da vida marinha aos HPAs resulta em sua bioacumulação em vários órgãos e tecidos, resultando em comprometimento do funcionamento normal do corpo (Peterson *et al.*, 2003).

De acordo com Bolognesi *et al.* (2006), o dano genético é detectável em diferentes espécies indicadoras presentes na área afetada pelo derramamento de óleo muitos anos após o acidente responsável pela liberação do produto químico.

Além dos riscos químicos do ponto de vista puramente fisiológico, os derramamentos de óleo nos oceanos também podem afetar a saúde humana do ponto de vista psicológico (Euzebio *et al.*, 2019). Kwok *et al.* (2017) documentaram o impacto psicológico de indivíduos envolvidos na limpeza de um derramamento de óleo no Golfo do México. O estudo mostrou que os impactos do derramamento, como danos ao ecossistema, interrupção das indústrias locais, incluindo a pesca, e incerteza sobre os efeitos do óleo na saúde da população causaram um risco aumentado de eventos psicológicos adversos.

No acidente, ocorrido na costa Nordeste do Brasil no ano de 2019, muitos voluntários trabalharam na limpeza das praias atingidas, entre eles pescadores, moradores locais, estudantes, turistas e atletas. Um estudo realizado no estado de Pernambuco concluiu que a

venda de pescado teve um impacto negativo significativo, com o aumento do desemprego dos trabalhadores da indústria do turismo (Araújo *et al.*, 2020).

3.4. Biodegradação na remoção de hidrocarbonetos de petróleo em ambiente marinho

Os sedimentos marinhos constituem um ambiente complexo, caracterizado por uma enorme variabilidade nas vias de formação, características físico-químicas, organismos vivos e tipos de contaminação. Eles representam um reservatório potencial de compostos tóxicos, pois estão frequentemente sujeitos a insumos antropogênicos (Albarano *et al.*, 2020; Maletić *et al.*, 2018; Rocchetti *et al.*, 2012).

Em particular, os hidrocarbonetos de petróleo podem ficar presos nos sedimentos por um longo tempo devido à sua natureza hidrofóbica (Pino-Herrera *et al.*, 2017), tornando-se uma preocupação ambiental e um problema de saúde pública, pois podem ser liberados dos sedimentos que podem representar mais de uma fonte primária de contaminação (Maletić *et al.*, 2018; McGenity *et al.*, 2012). Por esses motivos, o tratamento de sedimentos marinhos contaminados por hidrocarbonetos representa uma necessidade urgente e se tornou um importante tema de pesquisa (Pino-Herrera *et al.*, 2017).

As técnicas de limpeza de materiais perigosos são altamente influenciadas por vários fatores, como conteúdo de óleo e características do local do derramamento de óleo (Xueqing Zhu *et al.*, 2001). Uma variedade de métodos para controlar derramamentos de óleo em linhas costeiras marinhas e ecossistemas de água doce foi estabelecida, como barragens e barreiras flutuantes, materiais de coleta de óleo, vasos de coleta de óleo, materiais adsorventes, dispersantes químicos, surfactantes, degradação física, biodegradação e combustão de óleo no local (Li *et al.*, 2016).

Dentre as diferentes alternativas, a biodegradação por populações microbianas capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia representam uma tecnologia promissora para remediação de sedimentos (Usman *et al.*, 2018; Varjani, 2017; Varjani & Upasani, 2021). Essas estratégias, ecologicamente corretas e mais econômicas em comparação aos processos térmicos ou físico-químicos, vêm ganhando destaque graças a uma série de estudos sobre o comportamento microbiano para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo (Huesemann *et al.*, 2002; Perelo, 2010).

As tecnologias de biorremediação, por outro lado, têm sido consideradas alternativas ecológicas promissoras para combater os derramamentos de óleo, evitando as implicações negativas associadas às técnicas físico-químicas, como a introdução de dispersantes químicos ou a queima do óleo derramado (Almeida *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Priya *et al.*, 2016).

O objetivo da biorremediação é transformar substâncias tóxicas em substâncias não tóxicas, como dióxido de carbono, água e ácidos graxos, removendo completamente os hidrocarbonetos de petróleo do ambiente afetado e retornando a zona de derramamento de óleo afetada às suas condições originais (Xueqing Zhu *et al.*, 2001). A vantagem da biorremediação é que o produto da quebra é dióxido de carbono, água e ácidos graxos de hidrocarbonetos (El Mahdi *et al.*, 2017). O processo biológico é um método alternativo para eliminar toxinas, uma vez que este procedimento não causa efeitos ambientais adversos.

A biorremediação pode ser dividida em duas estratégias: bioestimulação, adicionando nutrientes à área afetada para estimular os metabolismos de degradação do óleo pela comunidade microbiana naturalmente presente; e bioaumento onde microrganismos degradadores de óleo conhecidos são adicionados para aumentar sua abundância entre a comunidade microbiana local. Uma combinação desses dois métodos provou aumentar a degradação de hidrocarbonetos (Almeida *et al.*, 2013; Nikolopoulou *et al.*, 2013; Perdigão *et al.*, 2021).

Os obstáculos associados à biodegradação dos hidrocarbonetos surgem em função da ligação desses compostos hidrofóbicos às partículas do solo e à solubilidade reduzida em água, resultando em baixa biodisponibilidade para os microrganismos e na consequente paralisação do processo (Cortis & Ghezzehei, 2007; Santos *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018).

Nesse contexto, a utilização de compostos biossurfactantes surge como uma alternativa ecológica em relação aos surfactantes químicos possuindo muitos atributos desejáveis como: produção por microrganismos através de materiais renováveis; inúmeras variedades químicas, ampla gama de aplicações e compatibilidade com o lançamento no meio ambiente (Karlapudi *et al.*, 2018; Perfumo *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2016).

3.5. Biossurfactantes

Os surfactantes são compostos anfifílicos com uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica, preferencialmente distribuídos por pontes de hidrogênio em interfaces líquidas com diferentes graus de polaridade, ou seja, interfaces óleo/água ou ar/água (Ostendorf *et al.*, 2019). As porções apolares consistem em cadeias de hidrocarbonetos, enquanto as porções polares são iônicas (catiônicas ou aniônicas), não iônicas ou anfotéricas. Essas propriedades permitem que os surfactantes reduzam a tensão superficial e interfacial e formem microemulsões que permitem que os hidrocarbonetos se dissolvam em água e vice-versa (Jahan *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2018).

Os biossurfactantes são geralmente classificados de acordo com sua origem microbiana e com sua composição química (Sobrinho *et al.*, 2013). As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídeo, lipoproteínas, fosfolipídeos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Bezerra *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2020). A porção lipofílica pode ser uma cadeia de um ácido graxo com 10-18 átomos de carbono ou mais; ou pode ser uma proteína ou peptídeo com uma elevada proporção de aminoácidos contendo cadeias laterais hidrofóbicas. A porção hidrofílica pode ser um éster, um grupo hidroxila, um grupo fosfato, um grupo carboxílico, um carboidrato ou um peptídeo/proteína com elevada proporção de aminoácidos de cadeias laterais hidrofílicas (Santos *et al.*, 2017).

Uma diversidade de microrganismos, tais como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, são capazes de sintetizar biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares (Santos *et al.*, 2017). Dentre as principais espécies e gêneros investigados, destacam-se: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida lipolytica*, *Candida bombicola*, dentre outras (Campos *et al.*, 2015).

Os biossurfactantes são utilizados em diversos setores devido ao seu papel como agente espumante. Alguns estudos relataram que os biossurfactantes, como os ramnolipídeos, possuem excelentes propriedades de formação de espuma (Cohen & Exerowa, 2007; Özdemir & Helvacı, 2014), enquanto outros (por exemplo, soforolipídeos e glicolipídios de levedura) possuem habilidades moderadas de formação de espuma. Essas propriedades de formação de espuma podem ser exploradas para reduzir a viscosidade do óleo. Os biossurfactantes são usados como detergentes na limpeza de tanques de armazenamento de petróleo bruto.

Joshi-Navare *et al.*, (2013) relataram que os soforolipídeos produzidos a partir do óleo de *Jatropha* por *Candida bombicola* (ATCC22214) eram capazes de funcionar como um limpador de manchas. Quando combinados com detergentes, os soforolipídeos microbianos atuam como removedores de manchas fortes devido ao seu alto desempenho de umectação, reduzindo assim o tempo de imersão necessário durante o processo de lavagem.

Uma análise de lixiviação de tecido mostrou que um biossurfactante bruto de *Pseudozyma* sp. O NII08165 consistia em uma combinação de três lipídeos manosileritritol (MEL), juntamente com alguns glicolipídios desconhecidos, e que estes removiam manchas por fusão e poderiam ser usados em uma formulação de detergente para a roupa (Sajna *et al.*, 2013). Os biossurfactantes também são usados na área têxtil, solventes de drogas, pesticidas, na desidratação terciária de óleo e em *sprays* fungicidas para plantas, bem como em várias superfícies biológicas.

A eficiente ação dos biossurfactantes pode ser constatada na biorremediação conduzida na limpeza do derramamento de 41 milhões de litros de petróleo causado pelo navio Exxon Valdez, no Golfo do Alasca, em 1989, possibilitando uma aplicabilidade efetiva deste método no tratamento de futuros derramamentos de óleo em circunstâncias adequadas (Souza *et al.*, 2014). Sendo assim, a utilização de biossurfactantes surge como alternativa de aumentar a solubilidade dos compostos hidrofóbicos, promovendo a dessorção e solubilização de hidrocarbonetos e facilitando a assimilação destes compostos por células microbianas (Sarubbo *et al.*, 2022).

CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais e equipamentos

- 2,4-Diclorofenol;
- 2-MetilNaftaleno;
- Acetonitrila;
- Agitador do tipo Shaker;
- Agitador magnético;
- Água destilada (H₂O);
- Autoclave;
- Banho termostático;
- Biossurfactante A60;
- Centrífuga;
- Citrato de sódio;
- CLAE
- Cloreto de cálcio;
- Cloreto de ferro;
- Cloreto de sódio (NaCl);
- Eppendorfs;
- Espectrofotômetro Uv-Vis;
- Estufa;
- Extrato de levedura;
- Fenantreno;
- Fluxo Laminar;
- Fosfato de sódio bibásico;
- Fosfato de sódio monobásico;
- Gel de poliacrilamida;
- Geladeira;
- Glicerol (C₃H₈O₃);
- Hexano;
- n-Hexadecano (CH₃(CH₂)₁₄CH₃);
- Nitrato de amônio;
- Óleo mineral lubrificante;
- Peptona Bacteriológica;
- Peroxido de hidrogênio;
- Pipetas e ponteiros de pipetas;
- Potenciômetro (pHmetro);
- *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA;
- Sulfato de magnésio;
- Tensiômetro SEO Phoenix 150;
- Tolueno;
- Vidrarias de uso geral (béqueres, Erlenmeyers, balões volumétricos, cadinho, placa de Petri, provetas);

4.2. Métodos

4.2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado no presente estudo foi a cepa *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA, proveniente de um poço de petróleo de Canto do Amaro (Mossoró/RN) e pertencente a coleção de culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

4.2.2. Biossurfactante industrial

O biossurfactante industrial utilizado no presente projeto foi cedido pela empresa Syensqo Oil & Gas Solutions. Assim, por questão de sigilo comercial o mesmo será citado no presente estudo como biossurfactante industrial.

4.2.2.1. Caracterização do biossurfactante industrial

4.2.2.1.1. Índice de emulsificação (%)

A capacidade de emulsificação do biossurfactante foi investigado usando diferentes dosagens de cloreto de sódio (0%, 2,0%, 3,5% e 5,0%, m/v), simulando assim condições parecidas com água marinha, a fim de verificar o comportamento do biossurfactante industrial, hexadecano, tolueno e óleo de motor como líquidos hidrofóbicos. Baseado em Cooper & Goldenberg (1987) com pequenas modificações, 1,0 mL do biossurfactante (em diferentes concentrações) foi adicionado em concentrações variadas de soluções salinas em um tubo contendo 1,0 mL de n-Hexadecano, Tolueno ou óleo de motor. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos em alta rotação e permaneceu em repouso por determinados tempos de 24, 72, 120 e 240 horas. Os índices de emulsificação foram obtidos pela Equação (1) conforme Wei *et al.* (2005). As análises foram realizadas em triplicatas.

$$E_t(\%) = \frac{H_{emulsão}}{H_{total}} * 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo, E_t = índice de emulsificação após determinado tempo de análise (%) e $H_{emulsão}$ = altura da emulsão (cm), H_{total} = altura total da solução (cm).

4.2.2.1.2. Determinação de tensão superficial

Visando a determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante, foram realizadas medições semiautomáticas de tensão superficial através do Goniômetro DSA100 *Drop Shape Analyzer System* da Krüss (Hamburgo, Alemanha) pela técnica da gota pendente, usando como parâmetro a curvatura de uma gota matemática dada pela equação de

Young-Laplace calculada pelo próprio equipamento. O ensaio foi realizado no Núcleo de Ensino e Pesquisa de Petróleo e Gás (NUPEG) da UFRN.

4.2.3. Experimentos de biodegradação

Os cultivos foram realizados em frascos de vidro de 250 mL com tampa rosqueável, sendo realizado um pequeno furo e acoplado um pequeno tubo PVC ligado a um frasco de polipropileno contendo 10 mL da solução de hidróxido de sódio (1,0 M) para a saída de gases formados durante a biodegradação e, assim, evitando-se a contaminação por microrganismos do ambiente externo.

Figura 4. 1 - Montagem do experimento



Fonte: Autoria Própria, 2024

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA, conservada em glicerol 20%, foi previamente reativada em caldo nutriente composto por Peptona (5,0 g/L), Extrato de Levedura (3,0 g/L) e NaCl (5 g/L), tendo seu pH corrigido com solução tampão fosfato de sódio pH 7,0 (Peng et al., 2008). O Erlenmeyer contendo o caldo foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Em seguida, foi realizado um pré-inoculo da solução estoque para o meio e, por fim, os Erlenmeyers foram incubados em incubador rotativo (TE-421, TECNAL) a 150 rpm e 37°C por 24 h.

Posterior ao crescimento, o meio com a bactéria foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min e padronizada com solução de água salina 0,9% (m/v), até uma absorbância de 0,4 em um comprimento de onda de 600 nm, para serem adicionados aos experimentos em concentração pré-estabelecidas.

Ao microcosmo foi adicionado o caldo Bushnell Haas- BH (150mL) (1,0 g/L de KH_2PO_4 , 1,0 g/L de K_2HPO_4 , 1,0 g/L de NH_4NO_3 , 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/L de FeCl_3

e 0,02 g/L de CaCl₂.2H₂O) previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos, o biossurfactante e os hidrocarbonetos em proporções estabelecidas conforme o delineamento experimental que está descrito nas Tabelas 4.1 e 4.2, seguida pela inoculação com a *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA (1% v/v). Ensaios controle foram realizados com sem a adição do biossurfactante (1) e sem a adição do biossurfactante e do hidrocarboneto (2).

Foi efetuado o acompanhamento da degradação, sendo os frascos mantidos com agitação constante (110 ± 10 rpm), a uma temperatura de 30 ± 2°C, em que a cada tempo de cultivo (0, 1, 3, 5 e 10 dias). Assim, foi retirado um microcosmo a cada tempo a fim de ser realizada as análises de acompanhamento da degradação e da influência de cada variável independente (fator) e suas combinações.

Conforme mencionado anteriormente, foi realizado um delineamento experimental composto central com 2 fatores e triplicata no ponto central (2² + 3 PC + 4 Pontos axiais), totalizando 11 ensaios, para cada hidrocarboneto. Nas Tabelas 4.1 e 4.2 está descrito, respectivamente, os níveis reais e codificados das variáveis concentração dos hidrocarbonetos (Fenantreno e 2-Metilnaftaleno) e concentração do biossurfactante. Os experimentos foram realizados de forma aleatória e a análise dos resultados se deu a partir do programa Statistica 10.0 (Statsoft, USA).

Tabela 4. 1 - Matriz do planejamento CCR para avaliar o efeito da concentração do fenantreno e do biossurfactante industrial na taxa de biodegradação do hidrocarboneto

Experimentos	Concentração de Fenantreno (mg/L) (X ₁)	Concentração de Biossurfactante (g/L) (X ₂)
1 (7°)*	20,0 (-1)	2,95 (-1)
2 (6°)	20,0 (-1)	17,69 (+1)
3 (8°)	50,0 (+1)	2,95 (-1)
4 (9°)	50,0 (+1)	17,69 (+1)
5 (2°)	13,85 (-α)	10,32 (0)
6 (5°)	56,15 (+α)	10,32 (0)
7 (1°)	35,0 (0)	0,10 (-α)
8 (3°)	35,0 (0)	20,76 (+α)
9 (C) (4°)	35,0 (0)	10,32 (0)
10 (C) (10°)	35,0 (0)	10,32 (0)
11 (C) (11°)	35,0 (0)	10,32 (0)

Fonte: Aatoria Própria, 2024

* Ordem da realização dos ensaios

Tabela 4. 2 - Matriz do planejamento CCR para avaliar o efeito da concentração do 2-MN e do biossurfactante industrial na taxa de biodegradação do hidrocarboneto

Experimentos	Concentração do 2-Metilnaftaleno (mg/L) (X ₁)	Concentração de Biossurfactante (g/L) (X ₂)
1 (3°)*	100,0 (-1)	2,95 (-1)
2 (10°)	100,0 (-1)	17,69 (+1)
3 (9°)	350,0 (+1)	2,95 (-1)
4 (1°)	350,0 (+1)	17,69 (+1)
5 (6°)	73,75 (-α)	10,32 (0)
6 (8°)	426,25 (+α)	10,32 (0)
7 (11°)	250,0 (0)	0,10 (-α)
8 (2°)	250,0 (0)	20,76 (+α)
9 (C) (4°)	250,0 (0)	10,32 (0)
10 (C) (5°)	250,0 (0)	10,32 (0)
11 (C) (7°)	250,0 (0)	10,32 (0)

Fonte: Autoria Própria, 2024

* Ordem da realização dos ensaios

A resposta principal para o delineamento experimental foi a taxa de biodegradação, que foi estimada através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) que permitiu a quantificação da concentração de hidrocarboneto não degradado. Foram realizadas também o acompanhamento das análises de pH e crescimento bacteriano.

4.2.3.1. Acompanhamento da degradação dos hidrocarbonetos de petróleo

4.2.3.1.1. pH

O acompanhamento do potencial hidrogeniônico (pH) foi verificado em todos os pontos de cada ensaio utilizando-se o potenciômetro mPA 210 (Tecnoyon, Brasil).

4.2.3.1.2. Crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA

O acompanhamento do crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA foi realizado a partir da medição da densidade óptica da solução, sendo retirado do microcosmo, a cada tempo de análise, 10 mL do meio com a bactéria e sendo centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos, posteriormente a parte mais densa que continha as células bacterianas foram resuspendidas em solução salina a 0,9% (m/v), sendo novamente centrifugadas, ao fim da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1,0 mL da solução salina nas células bacterianas. Por fim, essa solução final teve a absorbância medida utilizando-se o

espectrofotômetro Genesys 10 UV (Thermo Scientific, EUA) no comprimento de onda de 600 nm, comparando-a com uma curva de calibração para quantificar o crescimento microbiano (Apêndice I).

4.2.3.1.3. Taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos

Para determinar as concentrações de hidrocarboneto não degradados, e a taxa de biodegradação, foi realizado uma extração com hexano (1:1 v/v) e cloreto de sódio (10% m/v do volume de amostra), para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os hidrocarbonetos não degradados presentes no extrato foram identificados em sistema CLAE, modelo Accela (ThermoFisher Scientific, EUA). Este equipamento é composto por um detector de arranjo de diodos (operado em 278 nm) e uma coluna Shimadzu Shim-pack C18 (Thermo Scientific, EUA) com tamanho de 250 × 4,6 mm. A uma vazão de 0,6 mL/min e temperatura de 35°C, uma mistura de acetonitrila (ACN) com ácido acético (1,0%) foi utilizada como fase móvel nas seguintes condições operacionais: 0%-30% ACN até 10 min, gradiente 30%-100% ACN até 13 min, 100% ACN até 18 min, gradiente 100%-0% ACN até 20 min e 0% ACN até 30 min. As amostras analisadas foram pré-filtradas, anteriormente, com membrana de 0,22 µm e seus resultados foram obtidos após duas repetições. Os hidrocarbonetos em questão apresentaram os tempos de retenção de 22,8 minutos e 22,5 minutos para o fenantreno e para o 2-MetilNaftaleno, respectivamente.

O potencial de degradação foi expresso em termos de uma taxa de biodegradação (JOO *et al.*, 2008) que foi calculada de acordo com a Equação (2):

$$\text{Taxa de biodegradação (\%)} = \frac{(C_0 - C_x)}{C_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo: C_0 é a concentração inicial do hidrocarboneto e C_x é a concentração no determinado tempo de análise.

A concentração no tempo analisado (C_x) foi encontrada comparando os resultados com uma curva de calibração para quantificar a concentração do hidrocarboneto (Apêndice II e III).

4.2.4. Biodegradação da mistura dos hidrocarbonetos

Com o intuito de avaliar a capacidade da cepa em degradar ao mesmo tempo diferentes hidrocarbonetos, após as degradações individuais, foi realizado uma nova degradação com a mistura dos dois hidrocarbonetos na condição ótima, aquela que apresentou uma maior taxa de biodegradação para os dois hidrocarbonetos. Nesse experimento foram analisados apenas a degradação após 10 dias, sendo realizadas as análises de pH, crescimento bacteriano e taxa de

biodegradação seguindo as metodologias descritas nos itens 4.2.3.1.1, 4.2.3.1.2 e 4.2.3.1.3 respectivamente.

4.2.5. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicata, ou seja, cada ensaio em microcosmo foi realizado duas vezes. Os resultados do presente estudo foram representados graficamente com o auxílio do programa Origin 2024. O teste de Tukey e os testes de média foram realizados para determinar diferenças significativas nas eficiências de degradação dos compostos modelos ($p \leq 0,05$). O programa *Statistica* v.10.0 (Statsoft, USA) foi utilizado para efetuar o teste de Tukey e avaliar o planejamento composto central. O programa Assistat 7.7 (UFMG, Brasil) foi utilizado para ser realizado o teste de média dos resultados encontrados.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÕES

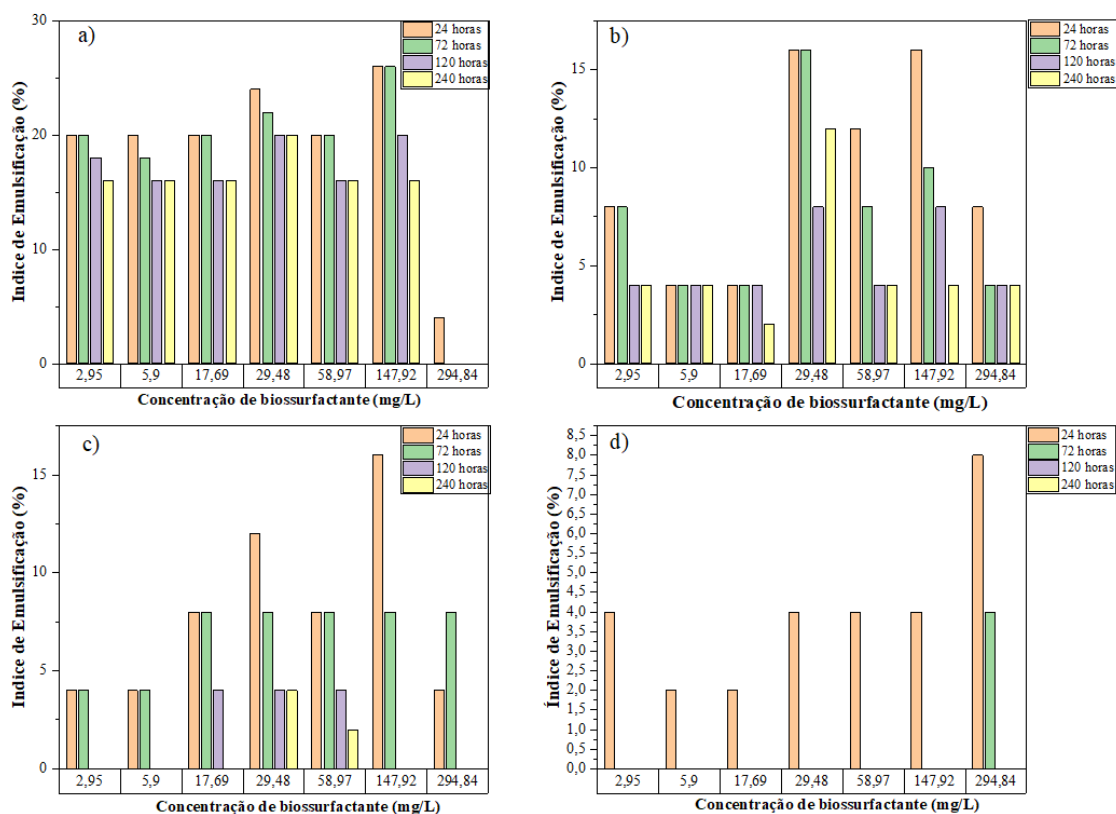
5. Resultados e Discussões

5.1.1. Índice de Emulsificação do biossurfactante industrial

Uma emulsão é formada quando a fase líquida está dispersa como gotículas microscópicas em outra fase líquida contínua. Os biossurfactantes podem estabilizar ou desestabilizar a emulsão (Banat *et al.*, 2014) e, segundo Santos *et al.* (2014), nem sempre a estabilidade desta emulsão está associada a baixas tensões superficiais.

Na Figura 5.1, o biossurfactante se mostrou eficaz na estabilização dos sistemas sem adição de NaCl (a), apresentando valores de até 26% para a concentração de 147,92 mg/L do biossurfactante nos tempos de 24 horas e 72 horas, sendo a concentração de 147,92 mg/L como a que apresentou os melhores resultados para três das quatro concentrações de sal testadas. Apenas no tempo de 24 horas, todos os testes apresentaram porcentagens de emulsificação, em todas as concentrações de biossurfactantes testadas assim como para todas as concentrações de NaCl avaliadas.

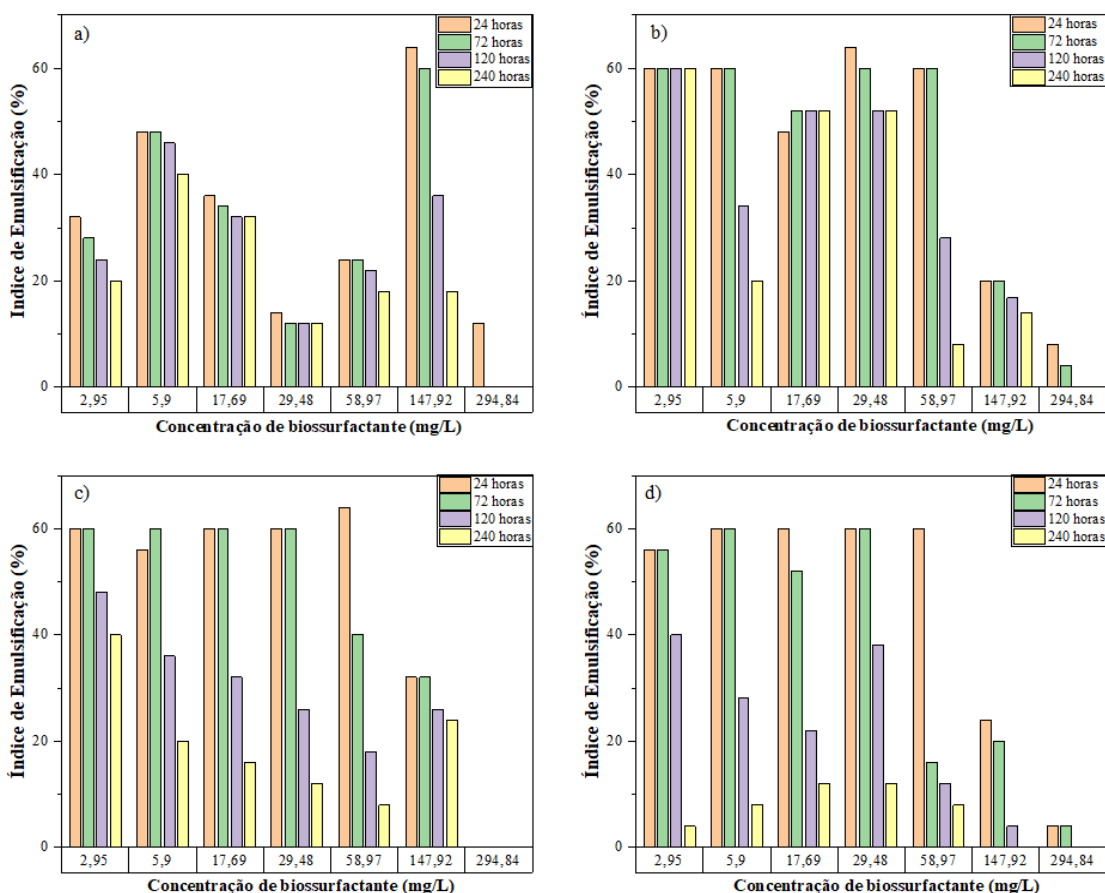
Figura 5. 1 - Índice de emulsificação determinado em diferentes instantes: 24, 72, 120 e 240 horas para o n-Hexadecano em diferentes concentrações salinas: a) 0% de NaCl, b) 2,0% de NaCl, c) 3,5% de NaCl e d) 5,0% de NaCl.



Fonte: Autoria Própria, 2024

A concentração de 5,0 % de NaCl se mostrou como uma concentração alta para o biossurfactante em questão, sendo necessária uma concentração de biossurfactante maior (294,4 mg/L) para o mesmo apresentar valores de IE depois das 24 horas. A Figura 5.2 apresenta os resultados para o índice de emulsificação do biossurfactante industrial utilizando o solvente tolueno em diferentes concentrações salinas.

Figura 5. 2 - Índice de emulsificação determinado em diferentes instantes: 24, 72, 120 e 240 horas para o tolueno em diferentes concentrações salinas: a) 0% de NaCl, b) 2,0% de NaCl, c) 3,5% de NaCl e d) 5,0% de NaCl.



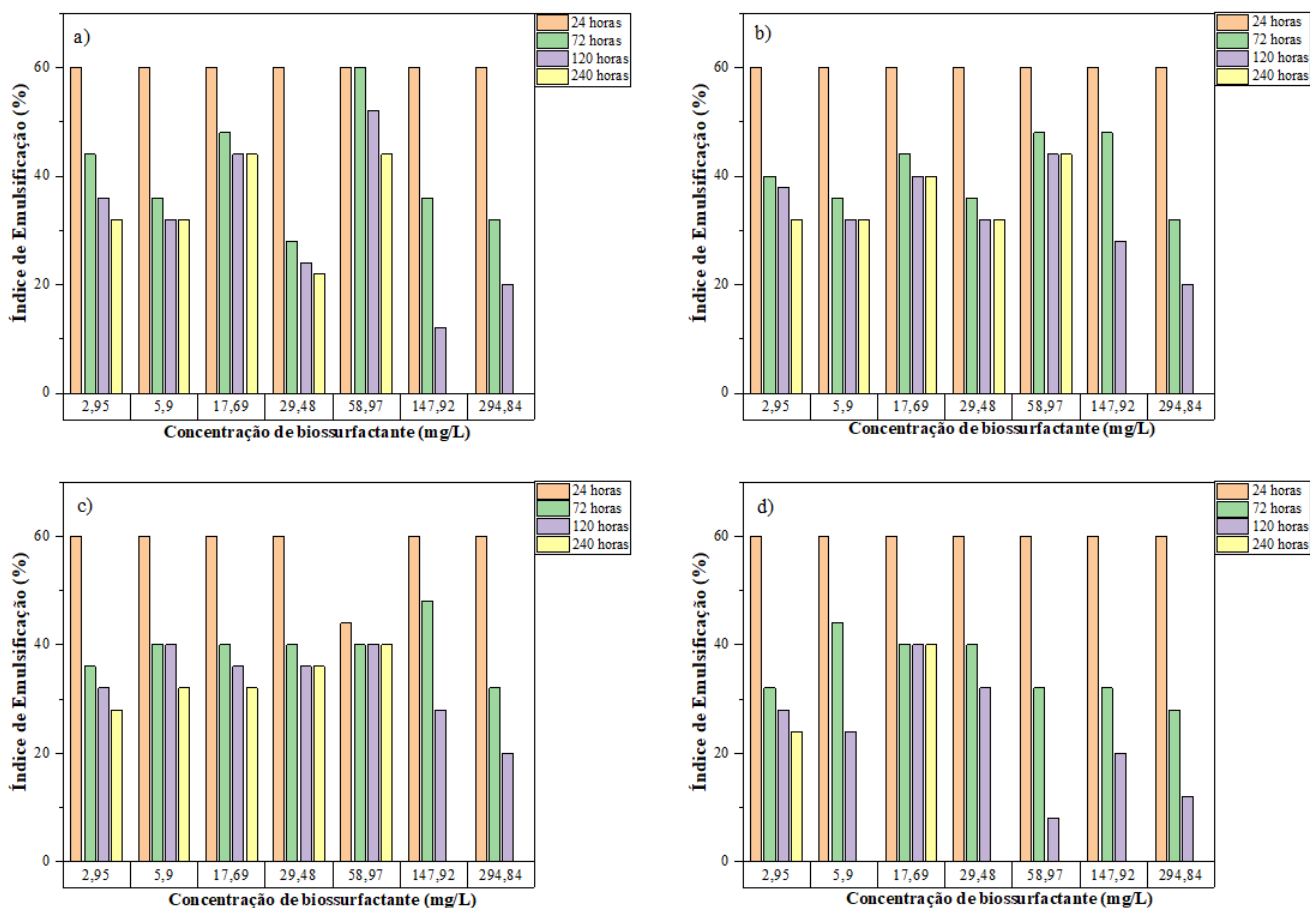
Fonte: Autoria Própria, 2024

O índice de emulsificação para o biossurfactante utilizando o tolueno se comportou de maneira diferente se comparada utilizando o n-Hexadecano, tendo em vista que apresentou valores de IE maiores em relação ao hidrocarboneto anterior, além de apresentar comportamento diferente em relação às concentrações de sal estudadas. Enquanto utilizando o n-Hexadecano, como solvente, apresentou melhores valores para a amostra sem a adição do sal, usando o tolueno como solvente, o biossurfactante apresentou melhores valores utilizando soluções salinas de 2,0 % de NaCl (b) chegando a valores de 64 % para a concentração de 29,48 mg/L de biossurfactante no tempo de 24 horas de análise.

O IE utilizando uma solução livre de NaCl (a) apresentou o maior valor para a concentração de 147,92 mg/L (64% para o tempo de 24 horas), já o teste utilizando solução de 3,5 % de NaCl (c) apresentou maior índice de emulsificação utilizando uma concentração de 58,97 mg/L (64 % para o tempo de 24 horas). A análise de índice de emulsificação apresentou maior valor para o teste com 5,0% de NaCl (d) utilizando soluções contendo 5,9 mg/L, 17,69 mg/L, 29,48 mg/L e 58,67 mg/L com um resultado igual a 60%.

A Figura 5.3 apresenta os resultados para o índice de emulsificação do biossurfactante industrial utilizando o solvente óleo mineral lubrificante em diferentes concentrações salinas.

Figura 5. 3 - Índice de emulsificação determinado em diferentes instantes: 24, 72, 120 e 240 horas para o óleo mineral lubrificante em diferentes concentrações salinas: a) 0% de NaCl, b) 2,0% de NaCl, c) 3,5% de NaCl e d) 5,0% de NaCl.



Fonte: Autoria Própria, 2024.

A partir da Figura 5.3, pode-se observar, que para a maioria dos testes para as concentrações salinas e concentrações de biossurfactante para o tempo de 24 horas as amostras analisadas apresentaram índices de emulsificação iguais a 60 %, com exceção da concentração de 58,97 mg/L, utilizando 3,5 % de NaCl, que apresentou para o tempo de 24 horas um valor

de 44 %. É importante frisar que para a concentração de 58,97 mg/L, a mesma apresentou os melhores resultados no decorrer das 240 horas para os testes sem a adição de NaCl e com adição de 2,0 % de NaCl, apresentando valores sempre maiores do que 40%.

Segundo a literatura, para que a emulsão seja considerada eficaz, o índice de emulsificação deve ser superior a 40% (Youssef *et al.*, 2004). Assim, considerando os resultados dos três solventes utilizados, pode-se perceber que ao utilizar o n-Hexadecano o biossurfactante utilizado no presente trabalho não se mostrou eficaz para emulsionar hidrocarbonetos com 16 carbonos.

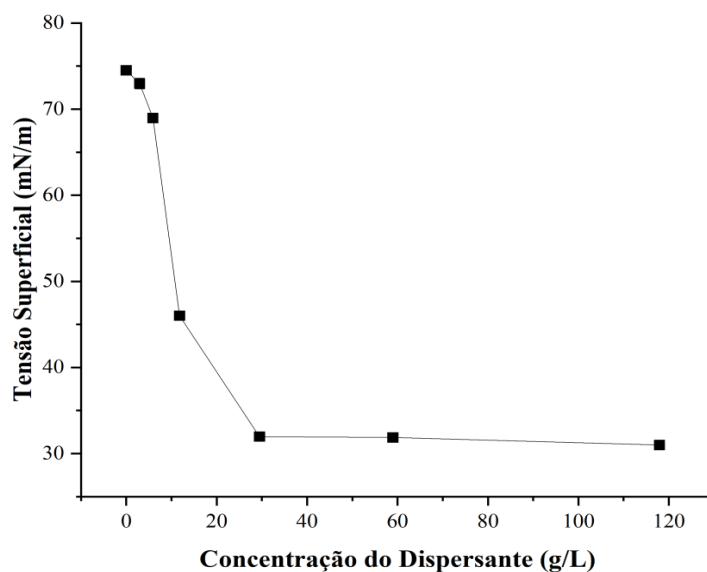
Para o tolueno, sem a adição de NaCl, apenas a concentração de 5,9 mg/L para todos os tempos se mostrou eficaz, apresentando valores iguais ou superiores a 40%. Para a concentração de 2,0% de sal, as concentrações de 2,95 mg/L, 17,69 mg/L e 29,48 mg/L apresentaram para todos os tempos de análise valores de emulsificação acima de 40%. A concentração de 3,5 % de NaCl apresentou apenas a concentração de 2,95 mg/L com valores iguais ou superiores a 40 %, indicando assim a única concentração capaz de manter o índice de emulsificação dentro do ideal e da eficácia.

Levando em consideração o óleo mineral lubrificante, observa-se que a concentração de 17,69 mg/L se mostrou eficaz ao final das 240 horas de análise, para as concentração de 0%, 2,0% e 5,0% de NaCl, enquanto a concentração de 58,97 mg/L se mostrou eficaz para as amostras com adição de 0%, 2,0% e 3,5% de NaCl.

5.1.2. Tensão superficial (mN/m)

A Figura 5.4 apresenta o comportamento da tensão superficial do biossurfactante industrial em diferentes concentrações.

Figura 5.4 - Tensão superficial do biossurfactante industrial em diferentes concentrações.



Fonte: Autoria Própria, 2024.

A determinação das propriedades tensoativas dos surfactantes, como a redução da tensão superficial e o valor da CMC, são os principais fatores na descrição dos surfactantes (Marcelino *et al.*, 2019). Os resultados apresentados na Figura 5.4 mostram a tensão superficial das soluções aquosas do biossurfactante em diferentes concentrações para 25°C. Na ausência do biossurfactante, a tensão superficial da água foi de 74,5 mN/m. Entretanto, a tensão superficial foi reduzida para $31,98 \pm 0,31$ mN/m. Assim, a CMC foi estimada em 29,48 g/L, ou seja, abaixo dessa concentração o biossurfactante encontra-se como monômeros, ainda resultando em diminuição da tensão superficial. No entanto, além da CMC, o aumento adicional da concentração de biossurfactante não altera a tensão superficial.

Um biossurfactante é considerado promissor quando reduz a tensão superficial do meio de produção do biossurfactante para 40 mN/m ou menos (Mulligan, 2004). Pode-se considerar, então, que o biossurfactante utilizado no presente estudo é considerado promissor.

5.2. Degradação dos hidrocarbonetos de petróleo

No presente estudo foram realizadas as degradações dos hidrocarbonetos fenantreno e 2-Metilnaftaleno isolados, realizando as análises de pH, crescimento bacteriano da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA e taxa de biodegradação.

5.2.1. pH

Um fator importante para a atividade de biodegradação é o pH, pois o mesmo pode afetar a solubilidade e biodisponibilidade dos poluentes e nutrientes.

A partir dos resultados de pH dispostos no Apêndice IV, podemos observar que os valores, para a degradação dos dois hidrocarbonetos, para os onze experimentos em todos os tempos analisados apresentaram valores maiores que 6,3, mostrando assim que os experimentos apresentaram valores de pH próximos à neutralidade, entre 6 e 8, podendo ser explicado pelo poder tamponante presente no meio utilizado para a degradação, favorecendo assim o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA no quesito pH do meio, uma vez que a grande maioria das bactérias importante para a biodegradação exibe um crescimento ótimo em valores de pH neutro ou próximos (Leahy & Colwell, 1990). Observa-se a diminuição dos valores de pH para os experimentos de degradação dos dois hidrocarbonetos, possivelmente, explicado pela geração de subprodutos ácidos gerados durante a biodegradação, como ácidos pirúvicos (Vidali, 2001).

Para que sejam realizadas comparações foi estudado a degradação dos dois hidrocarbonetos nas 5 concentrações analisadas, porém, sem a adição do biossurfactante, a fim de analisar qual a influência do biossurfactante no valor de pH (Apêndice V).

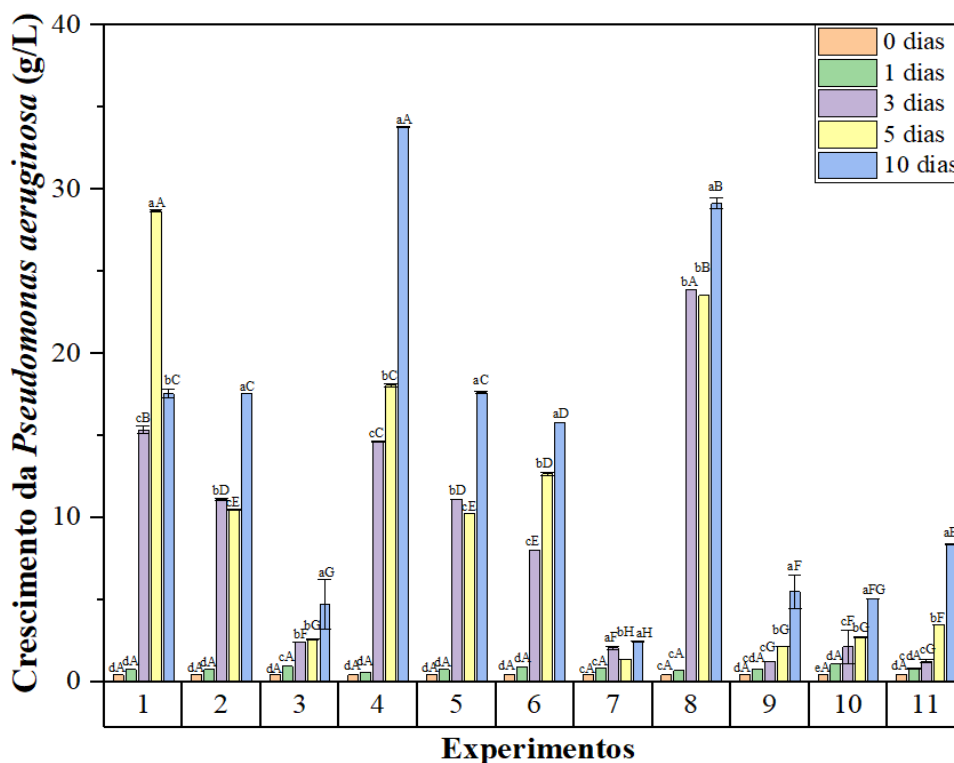
Observa-se que ao final dos 10 dias de degradação os valores de pH ficaram abaixo de 7,0, pH inicial para o sistema, demonstrando a formação de subprodutos ácidos, mesmo em baixas concentrações, corroborando com os resultados de pH, presentes no apêndice IV os valores foram maiores que 6,5.

Na presença do biossurfactante ocorreu um aumento no valor do pH ao final dos 10 dias da degradação, enquanto sem a presença do dispersante industrial os valores de pH se mantiveram menores do que o pH inicial do sistema. Observa-se também que ao final dos 10 dias de degradação não ocorreu diferença estatística significativa entre os experimentos estudados.

5.2.2. Crescimento bacteriano da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA

A Figura 5.5 apresenta o resultado para a análise de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA para os 11 experimentos durante os 10 dias de degradação do fenantreno.

Figura 5.5 - Valores de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA para os 11 experimentos durante os 10 dias de degradação do fenantreno na presença do biossurfactante.



*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula entre os experimentos, para cada tempo, não apresentam diferença estatística entre si. ** Valores seguidos pela mesma letra minúscula dentro do mesmo experimento não apresentam diferença estatística entre si.

Fonte: Autoria Própria, 2024.

Na Figura 5.5 o experimento 4, ao final dos 10 dias de degradação, apresentou um maior crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA, com 33,81 g/L, seguido do experimento 8 que apresentou um crescimento de 29,14 g/L, enquanto os experimentos 3 e 7 apresentaram um menor crescimento da bactéria em questão, 4,73 e 2,48 g/L respectivamente. Analisando esses resultados observa-se que os experimentos com a maior adição do biossurfactante industrial (20,76 g/L e 17,69 g/L) apresentaram um maior crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA, enquanto os experimentos com a menor adição do biossurfactante (2,95 g/L e 0,10 g/L) apresentaram um menor crescimento.

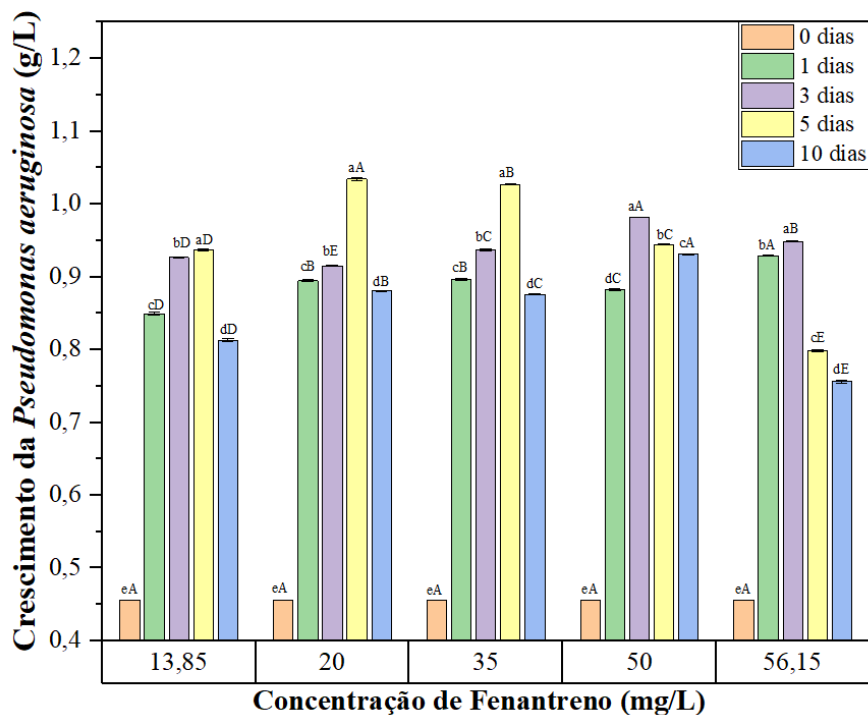
O maior crescimento da bactéria em decorrência de uma concentração de biossurfactante alta, pode ser explicado, pois, o dispersante utilizado no presente projeto se trata de material glicolípídios. Assim, além de auxiliar na dispersão e solubilização do hidrocarboneto, poderia também atuar como fonte de carbono para o crescimento da bactéria, auxiliando assim, na aceleração da degradação do fenantreno.

Analisando ainda os dados da Figura 5.5, é possível observar que o crescimento da bactéria, para todos os 11 experimentos, iniciou de maneira lenta, iniciando para todos os experimento com 0,4563 g/L e no tempo de 1 dia de degradação a maior concentração da bactéria foi para o experimento 10 com 1,09 g/L. Ao fim dos 3 dias de degradação, a bactéria continuou crescendo, sendo para alguns experimentos (1, 2, 4, 5, 6 e 8) tendo um crescimento mais acelerado, enquanto para o restante dos experimentos (3, 7, 9, 10 e 11) o crescimento da bactéria entre o tempo 1 e 3 ocorreu de maneira mais lenta, porém, positiva.

Em comparação com os experimentos dos pontos centrais (9, 10 e 11), pode-se observar que o crescimento da *Pseudomonas* apresentou ao final de 10 dias uma concentração variando de 5,07 g/L para o experimento 10 a 8,39 g/L para o experimento 11. Esses resultados apresentaram semelhança com os resultados encontrados para o experimento 3 e o experimento 7, ambos sendo os experimentos com as menores concentrações de biossurfactante adicionados.

Como controle foi realizado a degradação do fenantreno na ausência do biossurfactante, para se determinar se o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA é favorecido pela adição do biossurfactante. Os resultados para a degradação do fenantreno sem a adição do biossurfactante industrial estão descritos na Figura 5.6.

Figura 5. 6 - Valores de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA para as 5 concentrações de fenantreno estudadas sem a adição do biossurfactante, durante os 10 dias de degradação.



*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula entre os experimentos, para cada tempo, não apresentam diferença estatística entre si. ** Valores seguidos pela mesma letra minúscula dentro do mesmo experimento não apresentam diferença estatística entre si.

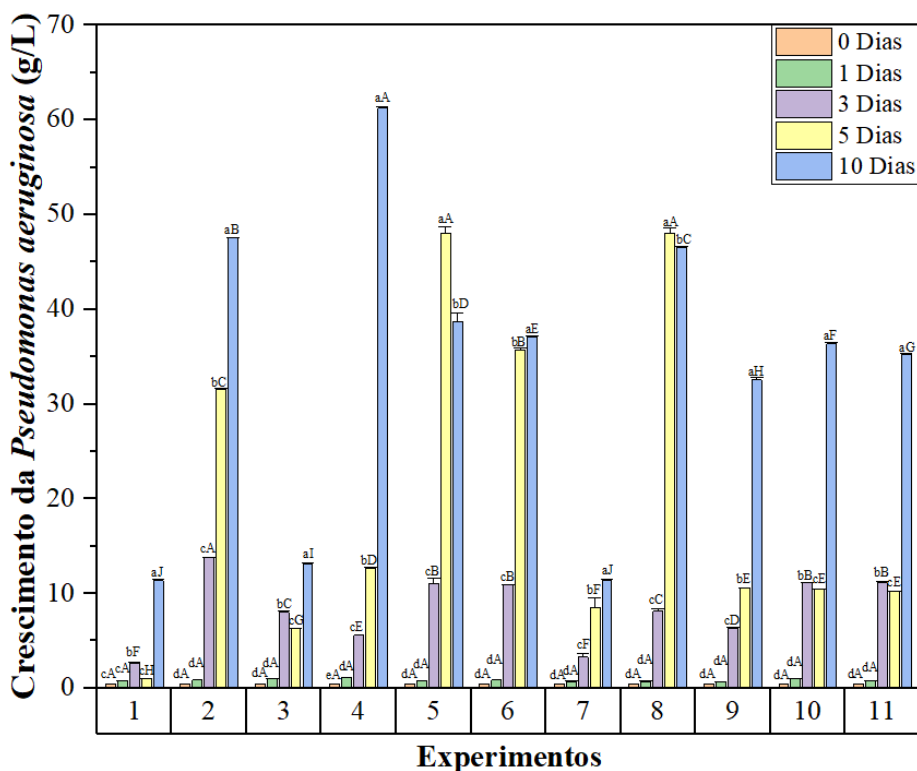
Fonte: Autoria Própria, 2024.

Ao fim dos 10 dias de degradação, observou-se que o crescimento para as cinco concentrações apresentou diferença estatística, variando de 0,76 g/L, para a concentração de 56,15 mg/L de fenantreno, a 0,88 g/L para a concentração de 20 mg/L de fenantreno.

Conforme Figura 5.6, pode-se observar que em comparação com o crescimento da bactéria apresentado na Figura 5.5, os experimentos sem a adição do biossurfactante industrial não proporcionaram um crescimento relativamente grande, tendo o seu maior crescimento para a concentração de 20 mg/L de fenantreno (1,03 g/L) para o tempo de 5 dias de degradação. Pode-se observar que até a concentração de 35 mg/L de fenantreno, a *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA conseguiu se desenvolver, obtendo um crescimento positivo até o quinto dia de degradação, em comparação concentrações mais altas de fenantreno, como 50 mg/L e 56,15 mg/L. A partir do terceiro dia de experimento, a bactéria não conseguiu se desenvolver apresentando uma diminuição no seu crescimento. Logo, altas concentrações do hidrocarboneto degradado podem atuar como um inibidor para o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA, caso não apresente um componente que favoreça o seu crescimento agindo como uma segunda fonte de carbono, como o biossurfactante. É importante destacar que a *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA produz ramnolipídeos, assim, justificando seu crescimento na ausência do biossurfactante industrial, além do ramnolipídeo produzido auxiliar o contato do fenantreno com a célula para a biodegradação.

A Figura 5.7 apresenta o resultado para a análise de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA para os 11 experimentos durante os 10 dias de degradação do 2-MN.

Figura 5.7 - Valores de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA para os 11 experimentos durante os 10 dias de degradação do 2-MN na presença do biossurfactante.



*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula entre os experimentos, para cada tempo, não apresentam diferença estatística entre si. ** Valores seguidos pela mesma letra minúscula dentro do mesmo experimento não apresentam diferença estatística entre si.

Fonte: Autoria Própria, 2024.

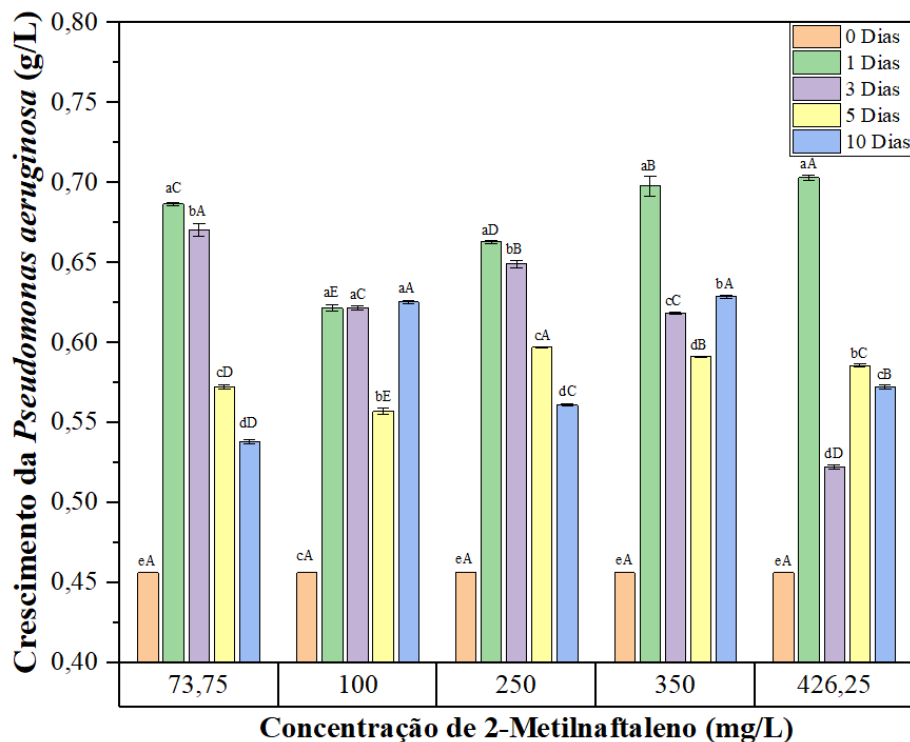
A partir da Figura 5.7, é observado um crescimento da bactéria em semelhança com o crescimento durante a degradação do fenantreno (Figura 5.5), apresentando para os experimentos com as maiores concentrações de biossurfactante (exp. 4, 8 e 2), um maior crescimento da bactéria degradadora e um menor crescimento para os experimentos com menores concentrações de surfactante adicionado (exp. 1, 3 e 7).

Porém, é importante destacar que durante a degradação do 2-MN todos os experimentos, com exceção do experimento, ao final dos dez dias de estudo, apresentaram maiores concentrações de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029, em comparação com os experimentos utilizando o fenantreno como fonte de carbono, esses resultados podem ocasionar em uma possível maior degradação e eliminação mais eficiente do hidrocarboneto 2-MN.

Esse maior crescimento da bactéria durante a degradação do 2-MN, em relação ao fenantreno é explicado pela menor quantidade de anéis aromáticos na estrutura do 2-MN, tornando-o mais propício a biodegradação e consumo pela bactéria.

Os resultados para o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* durante a degradação do 2-MN sem a adição do biossurfactante estão dispostos na Figura 5.8.

Figura 5.8 - Valores de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA para as 5 concentrações do 2-MN estudadas sem a adição do biossurfactante, durante os 10 dias de degradação.



*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula entre os experimentos, para cada tempo, não apresentam diferença estatística entre si. ** Valores seguidos pela mesma letra minúscula dentro do mesmo experimento não apresentam diferença estatística entre si.

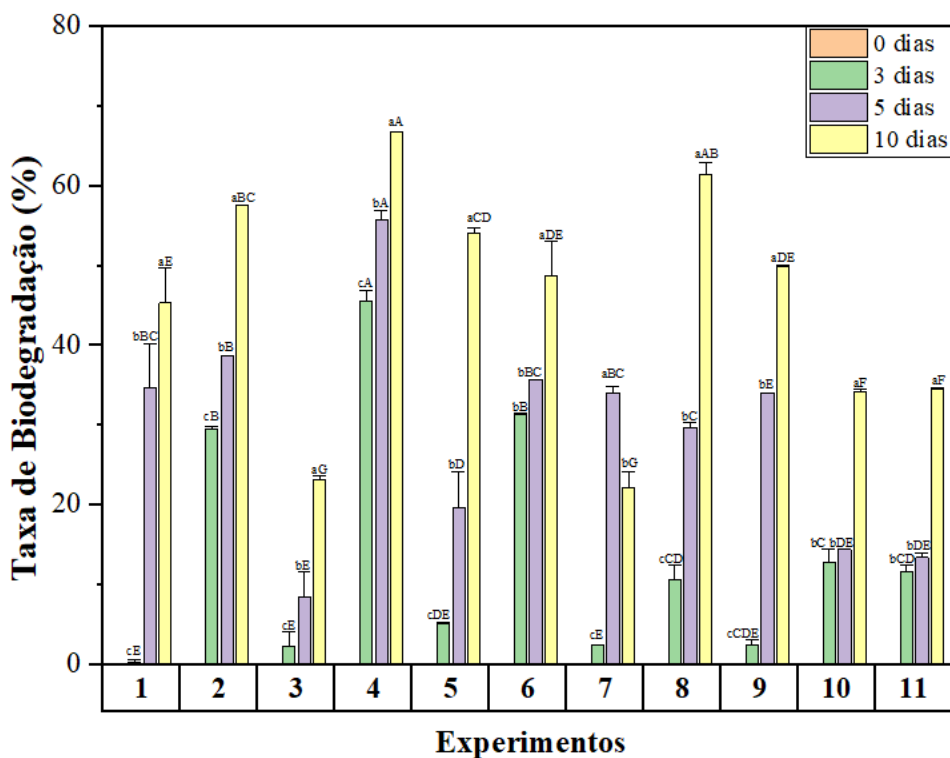
Fonte: Autoria Própria, 2024.

Ao final dos dez dias de degradação, sem a presença do biossurfactante, não houve um crescimento relativamente grande da bactéria estudada, apresentado maior crescimento para a concentração de 426,25 mg/L no dia 1 de degradação. Observa-se que para a degradação do 2-MN sem adição do biossurfactante, a *Pseudomonas* obteve um maior crescimento em todas as concentração testadas para o primeiro dia de degradação, a partir desse dia, ocorreu uma diminuição no crescimento, onde para as concentração de 73,75 mg/L e 250,0 mg/L essa diminuição do crescimento continuou até o final dos 10 dias de análise.

5.2.3. Taxa de Biodegradação dos hidrocarbonetos

A Figura 5.9 apresenta o resultado da taxa de biodegradação para os 11 experimentos durante os 10 dias de degradação do fenantreno.

Figura 5.9 - Taxa de Biodegradação do fenantreno para os 11 experimentos durante os 10 dias de degradação na presença do biossurfactante.



Fonte: Autoria Própria, 2024.

*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula entre os experimentos, para cada tempo, não apresentam diferença estatística entre si. ** Valores seguidos pela mesma letra minúscula dentro do mesmo experimento não apresentam diferença estatística entre si.

A partir dos dados apresentados na Figura 5.9, pode-se constatar que a taxa de biodegradação apresentou aumento significativo entre os três tempos estudados (3, 5 e 10 dias) para 7 dos 11 experimentos, sendo que os experimentos 6, 10 e 11 só apresentaram diferença significativa para o tempo de 10 dias. O experimento 7, que contém uma concentração de fenantreno e biossurfactante de 35,0 mg/L e 0,10 g/L respectivamente, foi o único que não apresentou uma taxa de degradação no tempo 10 maior que os demais. A partir do tempo de 5 dias de degradação, a bactéria não conseguiu degradar de maneira positiva, possivelmente explicada pela pouca concentração adicionada de biossurfactante, tendo em vista que o biossurfactante irá agir na dispersão desse hidrocarboneto, deixando-o biodisponível para o consumo da bactéria.

Como foi discutido e apresentado na Figura 5.5, o experimento 7 apresentou o menor crescimento da bactéria em questão, por apresentar esse resultado, era esperado que o mesmo apresentasse ao fim dos 10 dias de degradação os menores valores para a degradação e consumo do fenantreno. Outro fator que desfavorece o crescimento acentuado da bactéria e, consequentemente, diminui os valores da taxa de biodegradação para o experimento 7, é a baixa

concentração de biossurfactante. Porém, pelo fato de que a bactéria dispõe de fonte de carbono mais fácil para o seu crescimento, ou seja, como basicamente a única fonte de carbono existente no microcosmo é o fenantreno, a *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA apresenta dificuldade em metabolizar o hidrocarboneto aromático e usá-lo com eficiência para o seu consumo e crescimento.

Com o intuito de analisar quais fatores (variáveis independentes estudadas) apresentam influência na variável dependente (taxa de biodegradação), foi realizada uma análise no planejamento composto central, onde os resultados para o tempo de 10 dias relativos a cada experimento e suas variáveis estão descritas na Tabela 5.1.

Tabela 5. 1 - Resultados da taxa de biodegradação do fenantreno, em condições experimentais de acordo com a matriz do planejamento composto central.

Experimentos	Concentração de Fenantreno (mg/L) (X ₁)	Concentração de Biossurfactante (g/L) (X ₂)	Taxa de Biodegradação (%)
1	20,0 (-1)	2,95 (-1)	45,37 ^{e*}
2	20,0 (-1)	17,69 (+1)	57,65 ^{bc}
3	50,0 (+1)	2,95 (-1)	23,19 ^g
4	50,0 (+1)	17,69 (+1)	66,81 ^a
5	13,85 (- α)	10,32 (0)	54,08 ^{cd}
6	56,15 (+ α)	10,32 (0)	48,73 ^{de}
7	35,0 (0)	0,10 (- α)	22,19 ^g
8	35,0 (0)	20,76 (+ α)	61,43 ^{ab}
9 (C)	35,0 (0)	10,32 (0)	49,98 ^{de}
10 (C)	35,0 (0)	10,32 (0)	34,21 ^f
11 (C)	35,0 (0)	10,32 (0)	34,47 ^f

*Valores seguidos pela mesma letra minúscula, na vertical, não apresentam diferença estatística entre si

Fonte: Autoria Própria, 2024

Como já descrito na Figura 5.9 e na Tabela 5.1, ao final dos 10 dias de degradação, o experimento 4 apresentou uma maior taxa de biodegradação do fenantreno (66,81%), seguido pelo experimento 8 (61,43%), não apresentando diferença estatística significativa. Os dois experimentos que apresentaram as maiores degradações do hidrocarboneto são os que apresentaram as maiores concentrações de biossurfactantes adicionados (17,69 g/L e 20,76 g/L, respectivamente), sugerindo assim uma influência na adição do dispersante industrial.

Pode-se relacionar também os experimentos 4 e 8, os que apresentaram ao final dos 10 dias de degradação, a um maior crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA,

proporcionando assim uma maior taxa de degradação, tendo em vista, que quanto maior a quantidade de microrganismos presentes maior será a biodegradação do hidrocarboneto, favorecendo assim o controle ambiental naquele microcosmo.

Após a análise dos dados do planejamento fatorial foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para verificar se o modelo proposto para a taxa de degradação possuía significância estatística. A Tabela 5.2 apresenta os dados da análise de variância (ANOVA), e a Equação (3) apresenta o modelo encontrado para a taxa de biodegradação.

Tabela 5. 2 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial para a degradação do fenantreno.

F. Variação	GL	SQ	MQ	F Sign.	F Pred.
Regressão	5	2084,618	416,9236	12,06*	0,04**
Resíduo	5	172,888	34,5776	-	-
F. Ajuste	3	9,573	3,191	-	-
Erro Puro	2	163,345	81,6725	-	-
Total	10	2257,506	-	-	-
R²			0,92		

G.L – Grau de liberdade; SQ – Soma dos Quadrados; MQ- Média dos Quadrados. $F_{(5,5)} = 5,05$; $F_{(3,2)} = 19,16$.

Fonte: Autoria Própria, 2024

$$\text{Taxa de Biodegradação do Fenantreno (\%)} = 39,54 - 5,15X_1^{**} + 12,71X_1^2 + 27,94X_2 + 3,00X_2^2 + 15,67X_1X_2 \quad (\text{Eq. 3})$$

** X_1 – Concentração de Fenantreno (mg/L); X_2 – Concentração do biossurfactante (g/L); X_1X_2 – Interação entre a concentração de Fenantreno e a concentração do biossurfactante.

Com os dados presentes na Tabela 5.2 e na Equação (3), é possível avaliar que o modelo apresentado é significativo ($F^* > 1$) e preditivo ($F^{**} < 1$). Pode-se observar também que o modelo em estudo conseguiu um valor de R^2 de 0,92, ou seja, o modelo proposto de biodegradação consegue explicar cerca de 92% dos resultados, resultado este bastante satisfatório.

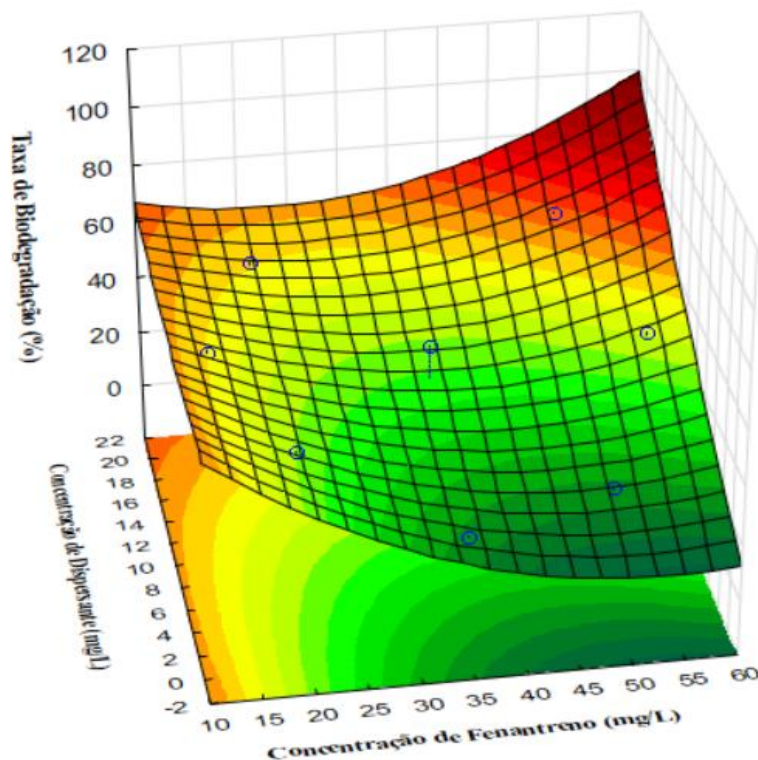
É possível observar, também, que a variável concentração de biossurfactante apresenta maior influência na taxa de biodegradação em comparação a variável concentração do fenantreno. A Equação (3) apresenta o modelo encontrado para a taxa de biodegradação, com esses dados, é possível analisar que apenas o termo linear para a variável biossurfactante apresentou-se como significativo no sistema. A variável concentração de fenantreno apresentou sinal negativo, demonstrando que essa variável atua de maneira negativa no sistema, ou seja,

quanto maior a concentração dessa variável menor será a taxa de biodegradação gerada pela *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA, sem a adição do biossurfactante. Esse resultado pode ser comprovado observando os valores de degradação do experimento 7, onde, a partir do tempo de 5 dias de degradação a bactéria não conseguiu degradar de maneira eficiente, tornando assim a taxa de biodegradação no tempo de 10 dias menor que nos outros tempos de análise.

A variável concentração de biossurfactante apresenta sinais positivos, demonstrando que a sua adição favorece a degradação do hidrocarboneto, sendo a única variável, a apresentar significância no modelo da biodegradação do hidrocarboneto. Esses resultados eram esperados tendo em vista que o biossurfactante como já apresentado nos resultados anteriores, auxiliam no crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP026, atuando como fonte de carbono, além de favorecer a dispersão e aumento da solubilidade do HPA no meio reativo.

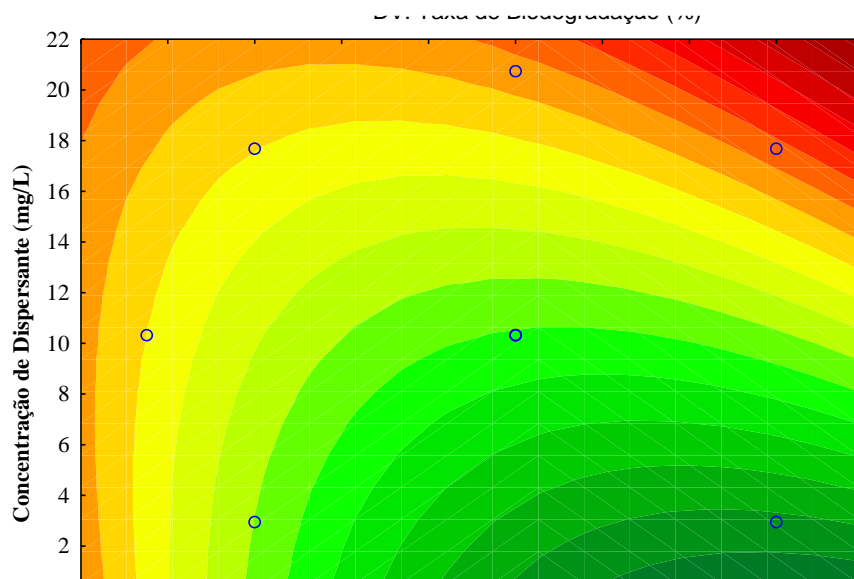
Para ilustrar os efeitos das variáveis na biodegradação do hidrocarboneto fenantreno, as Figuras 5.10 e 5.11 apresentam a superfície de resposta e a curva de contorno do modelo, respectivamente.

Figura 5.10 - Superfície de resposta para a taxa de biodegradação do fenantreno em função das variáveis concentração de fenantreno e concentração de biossurfactante.



Fonte: Autoria Própria, 2024.

Figura 5. 11 - Curvas de contorno para a taxa de biodegradação do fenantreno em função das variáveis concentração de fenantreno e concentração de biossurfactante.

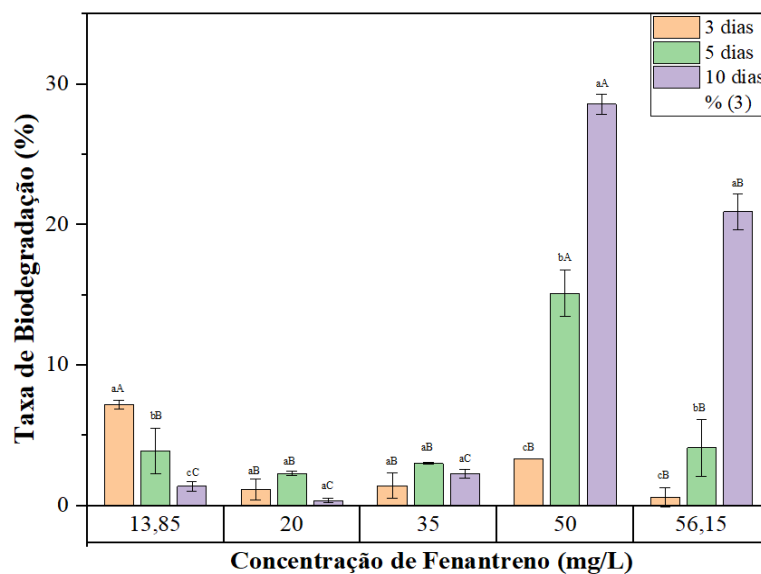


Fonte: Autoria Própria, 2024.

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 5.10 e 5.11, pode-se então constatar que as faixas de valores de intervalo de concentração de dispersante (g/L) na região ótima estão compreendidas entre 16 g/L a 22 g/L.

A Figura 5.12 apresenta os resultados da taxa de biodegradação do fenantreno, nas concentrações estudadas no planejamento experimental, sem a presença do biossurfactante industrial.

Figura 5. 12 - Taxa de biodegradação para as 5 concentrações de fenantreno estudadas sem a adição do biossurfactante, durante os 10 dias de degradação.



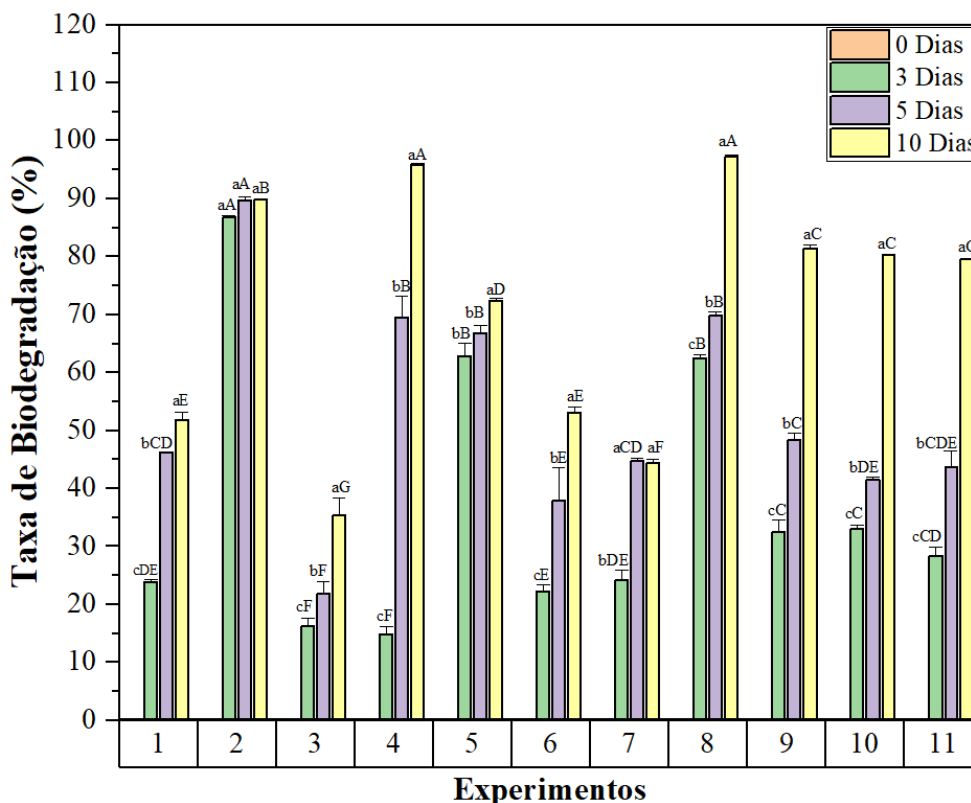
*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula entre os experimentos, para cada tempo, não apresentam diferença estatística entre si. ** Valores seguidos pela mesma letra minúscula dentro do mesmo experimento não apresentam diferença estatística entre si.

Fonte: Autoria Própria, 2024.

Os resultados apresentados demonstram a importância e influência da adição do biossurfactante, em que, sem a adição do biossurfactante, a maior taxa de biodegradação apresentada foi de 28,58% para a concentração de 50 mg/L de fenantreno. Observa que as três primeiras concentrações estudadas apresentaram um declínio em sua taxa de biodegradação no decorrer dos dez dias de estudo, podendo ser explicada, pois, como a única fonte de carbono disponível para as *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA era o hidrocarboneto adicionado, ao adicionar concentrações baixas desse HPA, não foi possível o seu consumo e consequentemente não foi possível a sua biodegradação.

Os resultados para a taxa de biodegradação do 2-MN na presença do biossurfactante, estão apresentados na figura 5.13

Figura 5.13 - Taxa de Biodegradação do 2-MN para os 11 experimentos durante os 10 dias de degradação na presença do biossurfactante.



*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula entre os experimentos, para cada tempo, não apresentam diferença estatística entre si. ** Valores seguidos pela mesma letra minúscula dentro do mesmo experimento não apresentam diferença estatística entre si.

Fonte: Autoria Própria, 2024.

A degradação do 2-MN, apresentou valores, ao final dos dez dias de análise, variando de 44,40 % para o experimento 7 a 97,22 % para o experimento 8, observa-se uma semelhança na degradação do hidrocarboneto em questão, em relação ao hidrocarboneto anterior (fenantreno), onde os experimentos com maiores concentrações do biossurfactante apresentaram maiores degradações (exp. 2, 4 e 8). Já os experimentos com menor adição do biossurfactante não apresentaram uma degradação relativamente satisfatória (exp. 1,3 6 e 7), evidenciando assim a importância da adição do dispersante e como este pode favorecer a taxa de biodegradação.

Observa-se também que a taxa de biodegradação está correlacionada ao crescimento bactéria, onde os experimentos com os maiores crescimento da *Pseudomonas* apresentaram as maiores taxas de degradação. É importante destacar que o aumento da taxa de biodegradação em todos os experimentos foi positiva, ocorrendo aumento graduados ao passar dos tempos de análise, resultando assim em resultados positivos para a pesquisa.

Com o intuito de analisar quais fatores (variáveis independentes estudadas) apresentam influência na variável dependente (taxa de biodegradação), foi realizada uma análise no planejamento composto central, onde os resultados para o tempo de 10 dias relativos a cada experimento e suas variáveis estão descritas na Tabela 5.3.

Tabela 5. 3 - Resultados da taxa de biodegradação do 2-MN, em condições experimentais de acordo com a matriz do planejamento composto central.

Experimentos	Concentração de 2-MN (mg/L) (X ₁)	Concentração de Biossurfactante (g/L) (X ₂)	Taxa de Biodegradação (%)
1	100,0 (-1)	2,95 (-1)	51,89 ^{e*}
2	100,0 (-1)	17,69 (+1)	89,8 ^b
3	350,0 (+1)	2,95 (-1)	35,37 ^g
4	350,0 (+1)	17,69 (+1)	95,92 ^a
5	73,75 (-α)	10,32 (0)	72,39 ^d
6	426,25 (+α)	10,32 (0)	53,16 ^e
7	250,0 (0)	0,10 (-α)	44,40 ^f
8	250,0 (0)	20,76 (+α)	97,22 ^a
9 (C)	250,0 (0)	10,32 (0)	81,49 ^c
10 (C)	250,0 (0)	10,32 (0)	80,35 ^c
11 (C)	250,0 (0)	10,32 (0)	79,63 ^c

*Valores seguidos pela mesma letra minúscula, na vertical, não apresentam diferença estatística entre si

Fonte: Autoria Própria, 2024

A partir da Tabela 5.3, é possível confirmar o que já foi apresentado na Figura 5.13, observando que estatisticamente falando os experimentos 4 e 8 não apresentaram estatística nos seus resultados, sendo justamente os dois experimentos com as maiores adições do biossurfactante, apresentando também valores do 2-MN considerados altos de 350 mg/L e 250 mg/L, respectivamente. Os experimentos 1 e 6 também não apresentaram diferença significativa entre eles. É importante frisar e destacar que os experimentos considerados pontos centrais (9,10 e 11) apresentaram valores variando de 79,63% para o experimento 11 a 81,49% para o experimento 9, porém não foi apresentado diferença estatística, observando então que para o 2-MN a repetição no ponto central apresenta semelhança entre eles.

Após a análise dos dados do planejamento fatorial, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para verificar se o modelo proposto para a taxa de degradação possuía significância estatística. A Tabela 5.4 apresenta os dados da análise de variância (ANOVA), e a Equação (4) apresenta o modelo encontrado para a taxa de biodegradação.

Tabela 5. 4 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial para a degradação do 2-MN.

F. Variação	GL	SQ	MQ	F Sign.	F Pred.
Regressão	5	4269,64	853,928	42,15*	28,94 ^{n/p}
Resíduo	5	101,882	20,2596	-	-
F. Ajuste	3	99,589	33,1797	-	-
Erro Puro	2	2,293	1,1465	-	-
Total	10	4370,938	-	-	-
R²			0,98		

G.L – Grau de liberdade; SQ – Soma dos Quadrados; MQ- Média dos Quadrados. $F_{(5,5)} = 5,05$; $F_{(3,2)} = 19,16$.

Fonte: Autoria Própria, 2024

$$\text{Taxa de Biodegradação do Fenantreno (\%)} = 81,52 - 5,93 \cdot X_1 - 17,65 \cdot X_1^2 + 42,30 \cdot X_2 - 9,48 \cdot X_2^2 + 9,93 \cdot X_1 X_2 \quad (\text{Eq. 4})$$

** X_1 – Concentração de Fenantreno (mg/L); X_2 – Concentração do biossurfactante (g/L); $X_1 X_2$ – Interação entre a concentração de Fenantreno e a concentração do biossurfactante.

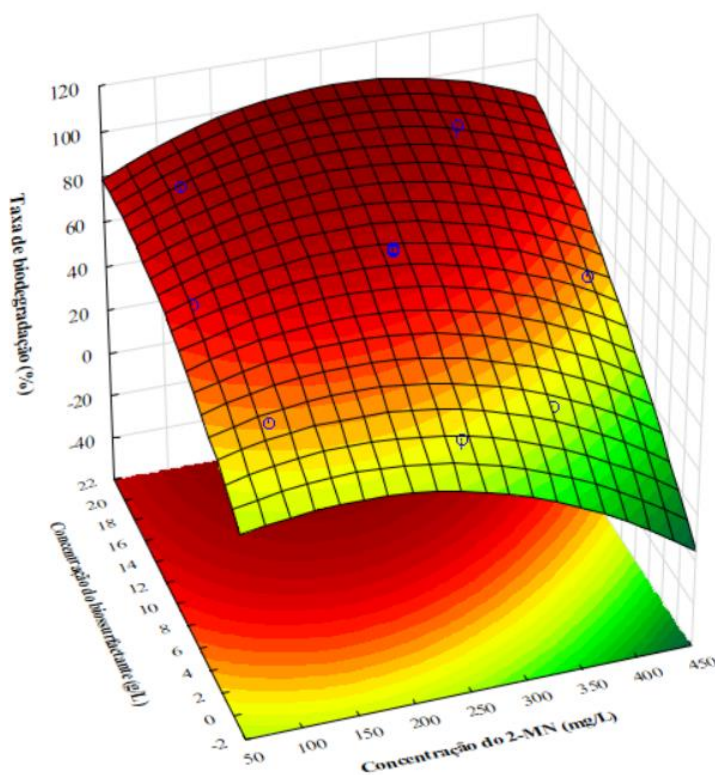
A partir da análise da Tabela 5.4, constata-se que o modelo proposto para a degradação do 2-MN apresentou significância estatística ($F^* > 1$), porém, não se apresentou como preditivo ($F^{**} > 1$), apresentando uma falta de ajuste considerável. Com esse resultado, pode-se perceber que o possivelmente esse modelo mostrado não se apresenta como o melhor para descrever o

comportamento e, conseqüentemente, a taxa de biodegradação desse hidrocarboneto em relação as concentrações de 2-MN e do biossurfactante.

Ainda analisando a Tabela 5.4, o R^2 apresentado é de 0,98, ou seja, 98 % dos resultados são explicados pelo modelo apresentado. A partir da equação 4, observa-se que todas as variáveis estudadas apresentam influência na resposta, taxa de biodegradação, seja ela uma influência positiva, como a variável concentração de biossurfactante e a interação entre as duas variáveis independentes, como também pode sofrer uma influência negativa, como no caso da variável concentração de 2-MN. Como já relatado anteriormente, essa influência negativa da variável hidrocarboneto, nos diz que quanto maior a sua concentração menor será a taxa de biodegradação. Enquanto a influência positiva da concentração de biossurfactante mostra que quanto maior a sua concentração, maior será a taxa de biodegradação, e quando ocorre a interação entre as duas variáveis, o sistema é influenciado positivamente, tendo em vista que a influência da concentração de biossurfactante é maior.

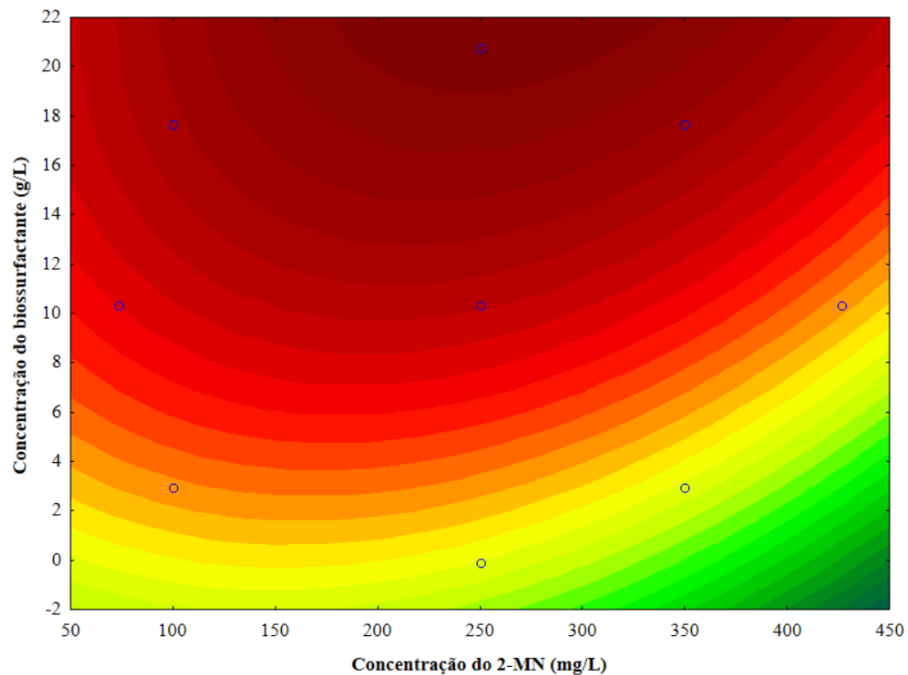
Para ilustrar os efeitos das variáveis na biodegradação do hidrocarboneto 2-MN, as Figuras 5.14 e 5.15 apresentam a superfície de resposta e a curva de contorno do modelo, respectivamente.

Figura 5. 14 - Superfície de resposta para a taxa de biodegradação do 2-MN em função das variáveis concentração de 2-MN e concentração de biossurfactante.



Fonte: Autoria Própria, 2024

Figura 5. 15 - Curvas de contorno para a taxa de biodegradação do 2-MN em função das variáveis concentração de 2-MN e concentração de biossurfactante

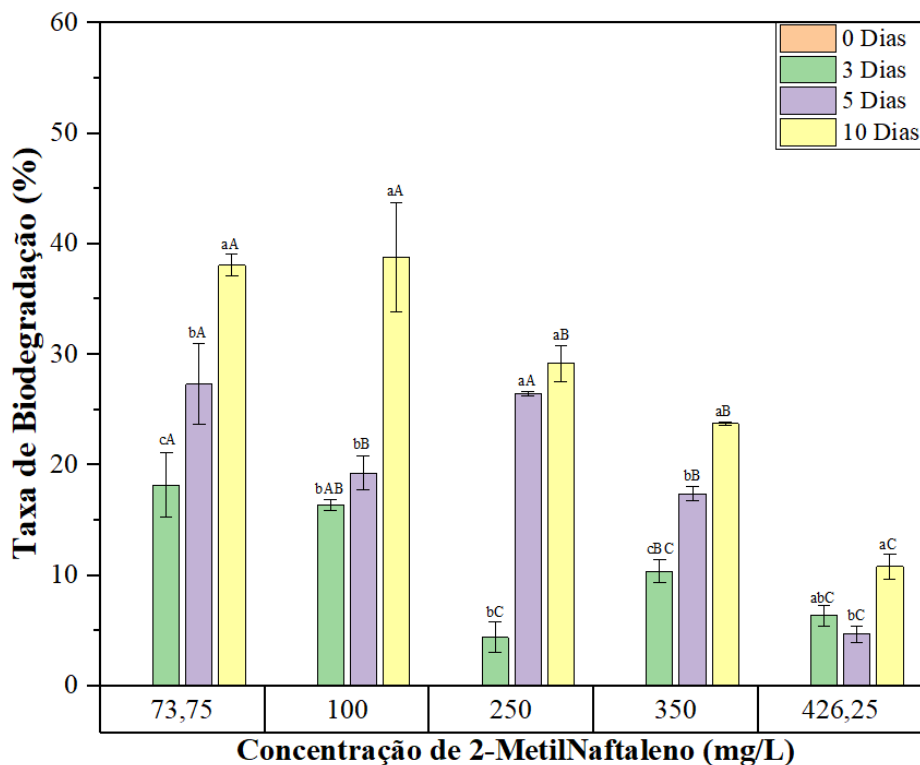


Fonte: Autoria Própria, 2024

Analisando as Figuras, 5.14 e 5.15, tem-se a confirmação do que foi apresentado no modelo proposto na equação 4, onde quanto maior a concentração do 2-MN menor será a resposta encontrada e quanto maior for a concentração do biossurfactante maior será o valor da resposta desejada. Observa também que a taxa ótima do dispersante estudado para esse sistema é de 16 g/L a 22 g/L.

A Figura 5.16 apresenta os resultados da taxa de biodegradação 2-MN, nas concentrações estudadas no planejamento experimental, sem a presença do biossurfactante industrial.

Figura 5.16 - Taxa de biodegradação para as 5 concentrações do 2-MN estudadas sem a adição do biossurfactante, durante os 10 dias de degradação.



*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula entre os experimentos, para cada tempo, não apresentam diferença estatística entre si. ** Valores seguidos pela mesma letra minúscula dentro do mesmo experimento não apresentam diferença estatística entre si.

Fonte: Autoria Própria, 2024.

De acordo com a Figura 5.16, observa-se que sem a adição do biossurfactante, a taxa de biodegradação apresenta uma diminuição em comparação aos resultados com a adição do dispersante (Figura 5.13), apresentando valores variando de 10,82% para a concentração de 426,25 mg/L a 38,80% para a concentração de 100,0 mg/L. Com isso, tem-se que ao aumentar a concentração de 2-MN a bactéria não é capaz de degradar de forma eficiente, tendo em vista que as duas maiores concentrações testadas apresentam as menores taxas de biodegradação, enquanto as duas menores concentrações apresentaram as maiores taxas. Observa-se que 2-MN pode agir como um composto tóxico, até mesmo, para a bactéria, além de não estar 100% biodisponível para o seu crescimento e consumo. Martirani-Von Abercorn *et al.*, 2016, constataram em seu trabalho que o 2-MN apresentou também efeitos tóxicos sobre as comunidades bacterianas testadas, diminuindo cerca de 3 vezes se comparada com a amostra controle.

Mesmo apresentando esses resultados, o consumo e degradação desse hidrocarboneto ao passar dos dias de análise se mostrou positivo. Se compararmos com os resultados

apresentados para a degradação do fenantreno sem a adição do dispersante, podemos notar que a bactéria conseguiu maior eficiência na biodegradação do 2-MN do que o fenantreno, sem a adição do biossurfactante. Isso pode ser explicado, pois a cadeia aromática do 2-MN é menor, em comparação a do fenantreno, então esse resultado já era esperado.

5.3. Degradação da mistura dos hidrocarbonetos de petróleo

Com a finalidade de simular uma amostra real, tendo em vista que esses hidrocarbonetos se encontram misturados em ambientes contaminados pelo derramamento de petróleo foi realizado a biodegradação da mistura dos dois hidrocarbonetos nas concentrações do experimento 4, ou seja, foram misturados 50,0 mg/L do fenantreno e 350,0 mg/L do 2-MN, além de ocorrer a adição de 17,69 g/L do biossurfactante industrial. Os resultados das análises estão dispostos na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Resultados das análises da degradação da mistura dos hidrocarbonetos de petróleo

Parâmetros	Resultados
pH	6,04 ± 0,63
Crescimento da <i>P. aeruginosa</i> (g/L)	44,95 ± 0,07
Taxa de degradação do fenantreno (%)	11,12 ± 1,93
Taxa de degradação do 2-MN (%)	82,95 ± 1,32

Fonte: Aatoria Própria, 2024.

Observa-se que o valor de pH apresentou valor de 6,04, considerado próximo a neutralidade, apresentado assim a possível formação de ácidos durante a degradação dos hidrocarbonetos. Esse valor próximo a neutralidade se deve a utilização de um meio tamponante para a degradação do contaminante tornando-se essencial para o crescimento da bactéria estudada.

A *Pseudomonas aeruginosa* se mostrou capaz de crescer positivamente ao final dos dez dias, apresentando valor de 44,95 g/L, demonstrando que ela foi capaz de desenvolver e crescer, utilizando tanto o biossurfactante quanto os hidrocarbonetos para a sua fonte de carbono. Se compararmos com a crescimento da bactéria apresentada durante a degradação dos dois hidrocarbonetos isolados, figuras 5.5 e 5.7, podemos observar que durante a degradação da mistura a bactéria apresentou um crescimento alto em relação a degradação do fenantreno, porém em comparação a degradação do 2-MN a bactéria apresentou resultados menores. Com isso percebe-se que durante a mistura dos dois hidrocarbonetos a *P.aeruginosa*, obteve certas dificuldades para o seu crescimento.

A bactéria mesmo apresentando valor de crescimento alto, apresentou certa dificuldade em degradar o fenantreno, degradando apenas 11,12% do contaminante, enquanto o 2-MN a

mesma foi capaz de degradar 82,95%, sendo assim mais eficaz na degradação do aromático que apresenta dos anéis na sua composição. Esse resultado pode ser um fator que influenciou uma maior degradação do 2-MN e uma menor degradação do fenantreno, como o 2-MN apresenta uma cadeia aromática menor, a bactéria conseguiu metabolizar melhor o hidrocarboneto invés de degradar o fenantreno. Porém, é importante frisar que a bactéria foi capaz de degradar de maneira promissora os dois hidrocarbonetos, na presença do biossurfactante, em apenas dez dias de degradação. Possivelmente, ao passar dos dias de biodegradação, a bactéria completaria a degradação do 2-MN e iria continuar degradando o fenantreno.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES

6. Conclusões

O biossurfactante industrial utilizado no presente trabalho apresenta características de extrema importância para o processo de biodegradação. O biossurfactante estudado mostrou ótimos resultados de índice de emulsificação para hidrocarbonetos e óleo lubrificante, apresentando resultados acima de 40% de emulsificação para diferentes concentrações de NaCl adicionados, em concentrações de biossurfactantes pequenas.

É possível constatar com os resultados, que o crescimento da bactéria é influenciado pela concentração do biossurfactante, demonstrando que além do mesmo favorecer a solubilidade do hidrocarboneto, favorece o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA, sendo utilizado como fonte de carbono pela mesma, indicando assim, que o biossurfactante industrial é também consumido pelo microrganismo, sendo assim, biodegradável.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA foi capaz de degradar o fenantreno, sendo possível degradar até 61,43 %, nas condições estudadas. Observa-se também que o biossurfactante industrial melhorou a taxa de biodegradação, sendo a única variável que apresentou influência significativa na resposta estudada. O modelo apresentado a partir dos resultados da análise estatística apresentou 92% dos dados explicados pelo mesmo, sendo valores de extrema importância, além de apresentar dados significativos e preditivos. Durante a degradação do 2-MN, a bactéria estudada apresentou melhores resultados, chegando a degradar cerca de 97,22 % do contaminante, nas condições estudadas. Novamente, o biossurfactante melhorou a degradação do hidrocarboneto, apresentando a maior influência positiva no modelo. O modelo apresentado para a degradação do 2-MN apresentou 98% dos resultados explicados pelo mesmo, além de apresentar resultados significativos.

Os resultados também demonstram que sem a adição do biossurfactante é possível sim, realizar a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, porém ocorre a necessidade de mais dias e possivelmente uma maior concentração de microrganismo.

A bactéria conseguiu degradar a mistura dos hidrocarbonetos aromáticos ao final dos dez dias, com a adição do biossurfactante, apresentando para o 2-MN uma taxa de 82,95% e para o fenantreno um valor de 11,12%. Ocorre a necessidade de maiores estudos com a utilização de amostras mais reais, e, possivelmente, uma mistura de microrganismos, tendo em vista que cada microrganismo produz mecanismos de degradação específicos, podendo atingir e degradar uma gama maior de hidrocarbonetos e poluentes.

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

ACHTEN, C.; ANDERSSON, J.T. Overview of Polycyclic Aromatic Compounds (PAC). *Polycycl Aromat Compd.*;35(2-4):177-186. doi: 10.1080/10406638.2014.994071. Epub 2015 Jun 16. PMID: 26823644; PMCID: PMC4714235.

AGÊNCIA Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2022. ANP, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2022>>. Acesso em: 22 set. 2022.

AGUELMOUS, A.; ZEGZOUTI, Y.; KHADRA, A.; FELLS, L.E.; SOUABI, S.; HAFIDI, M. Landfilling and composting efficiency to reduce genotoxic effect of petroleum sludge. *Environ. Technol. Innov.* 2020, 20, 101047.

ALBARANO, L.; COSTANTINI, M.; ZUPO, V.; LOFRANO, G.; GUIDA, M., LIBRALATO, G. Marine sediment toxicity: a focus on micro- and mesocosms towards remediation. *Sci. Total Environ.*, 708, 134837, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134837>.

AL-HAWASH, A.B.; ZHANG, J.; LI, S.; LIU, J.; GHALIB, H.B.; ZHANG, X.; MA, F. Biodegradation of n-hexadecane by *Aspergillus* sp. RFC-1 and its mechanism. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018 Nov 30;164:398-408. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.049.

ALMEIDA, C.M.; REIS, I.; COUTO, M.N.; BORDALO, A.A.; MUCHA, A.P. Potential of the microbial community present in an unimpacted beach sediment to remediate petroleum hydrocarbons. *Env. Sci. Pollut. Res. Int.*, 20, 3176–3184, 2013.

AL-ZAHRANI, R.M.; AL-OTIBI, F.; MARRAIKI, N.; ALHARBI, R.I.; ALDEHAISH, H.A. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by *Drechsleraspicifera* Isolated from Contaminated Soil in Riyadh, Saudi Arabia. *Molecules.* 2022; 27(19):6450. <https://doi.org/10.3390/molecules27196450>.

ARAÚJO, M.E.; RAMALHO C.W.N.; MELO P.W. Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil. *Cad Saúde Pública* [Internet]. 36(1):e00230319, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00230319>.

ATSDR, A. F. T. S. A. D. R. Case studies in environmental medicine toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). 1-68, 2009.

AYANGBENRO A.; BABALOLA O. Uma nova estratégia para ambientes poluídos por metais pesados: uma revisão de biossorventes microbianos. *Int J Environ Res Saúde Pública*, 14:94, 2017. <https://doi-org.ez18.periodicos.capes.gov.br/10.3390/ijerph14010094>.

BANAT I.M.; FRANZETTI A.; GANDOLFI I.; BESTETTI G.; MARTINOTTI M.G.; FRACCHIA L.; SMYTH T.J.; MARCHANT R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 87(2), 427-44, 2010. doi: 10.1007/s00253-010-2589-0.

BANAT, I.M.; SATPUTE, 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. 697. 2014, <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffmicb.2014.00697>.

BAYAT, A.; AGHAMIRI, S.F.; MOHEB, A.; VAKILI-NEZHAAD, G.R. Limpeza de derramamento de óleo da água do mar por materiais sorventes. *Chem. Eng. Tecnol.*, 28 , 1525-1528, 2005.

BENCHOUK A., CHIBANI A. Petroleum hydrocarbons biodegradation by *Pseudomonas* strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 9(2), 713-726, 2017.

BEZERRA, K. G. O.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Saponins and microbial biosurfactants: potential raw materials for the formulation of cosmetics. *Biotechnology Progress*, 34(6), 1482-1493, 2018.

BHATI S.; KUMAR V.; SINGH S.; SINGH J. Síntese, atividades biológicas e estudos de ancoragem de derivados de 1,3,4-oxadiazol incorporados à piperazina. *J Mol Struct*. 1191,197–205, 2019. <https://doi-org.ez18.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.molstruc.2019.04.106>.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; SCIUTTO, A. Bioindicadores no monitoramento do impacto genotóxico de longo prazo do derramamento de óleo: estudo de caso de Haven. *Mar. Environ. Res.*, 62 , S287–S291, 2006.

BRAKSTAD, O. G.; NORDTUG, T.; THRONE-HOIST, M. Biodegradation of dispersed Macondo oil in seawater at low temperature and different oil droplet sizes. *Mar. Pollut. Bull*. 2015, 93, (1- 2), 144-152.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; STAMFORD, T. C. M.; SARUBBO, L. A. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. *Toxicology Reports*, 2, 1164-1170, 2015.

CAO H, ZHANG X, WANG S, LIU J, HAN D, ZHAO B, WANG H. Insights Into Mechanism of the Naphthalene-Enhanced Biodegradation of Phenanthrene by *Pseudomonas* sp. SL-6 Based on Omics Analysis. *Front Microbiol.* 12, 761216, 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.761216. PMID: 34867892; PMCID: PMC8635735.

CAPPELLO S.; YAKIMOV, M.M. *Alcanivorax* In handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. In: Timmis KN, McGenity TJ, van der Meer et al. (eds). Springer, Berlin, 2010, pp. 1738–1745.

CETESB. Valores orientadores para solo e água subterrânea. 2016. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/solo/valores-orientadores-para-solo-e-agua-subterranea/>> Acesso em: 21 ago. 2023.

CHEBBI, A.; HENTATI, D.; ZAGHDEN, H.; BACCAR, N.; REZGUI, F.; CHALBI, M.; SAYADI, S.; CHAMKHA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2017, 122. 128–140. 10.1016/j.ibiod.2017.05.006.

COHEN R.; EXEROWA D. Surface Forces and Properties of Foam Films From Rhamnolipid. *Biosurfactants Advances in Colloid and Interface Science,* 134 24-34, 2007.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology,* 53(2), 224-229, 1987.

CORTIS, A.; GHEZZEHEI, T.A. On the transport of emulsions in porous media. *Journal of Colloid and Interface Science,* 313, 1-4, 2007.

COSTA FILHO, J. D. B. Avaliação do tratamento de solo contaminado com fenantreno através do processo de oxidação química combinado com a tecnologia de barreira reativa permeável em regime contínuo. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2018.

CRC. Handbook of Chemistry and Physics. 71st ed. Lide, D.R., ed. CRC Press, U.S.A. 1990.

DI TORO, D. M.; MCGRATH, J. A.; STUBBLEFIELD, W. A. Predicting the toxicity of neat and weathered crude oil toxic potential and the toxicity of saturated mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal,* 26, 24-36, 2007.

EFEVBOKHAN V.E., HYMORE F.K., AYOOLA A.A., ADEEYO O.A. Comparison of Aerobic and Anaerobic Bioremediation of Polluted Water Samples. *American International Journal of Contemporary Research*. 4(4), 120-126, 2014.

EL MAHDI, A.M.; AZIZ, H.A.; BHAKTA, J.N. Hydrocarbon Biodegradation Using Agro-Industrial Wastes as Co-Substrates. In *Handbook of Research on Inventive Bioremediation Techniques*; IGI Global: Hershey, PA, USA, pp. 155–185, 2017.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Toxicological review of 2-methylnaphthalene. EPA 635/R-03/010. Washington: EPA; 2003.

EUZEBIO C.S.; RANGEL G. D.A. S.; MARQUES R.C. Derramamento de petróleo e seus impactos no ambiente e na saúde humana. *Rev Bras Ciências Ambient.*, 52(52), 79-98, 2019. Disponível em: http://www.rbciamb.com.br/index.php/Publicacoes_RBCIAMB/article/view/588.

FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; VALENZUELA-ENCINAS, C.; MARSCH, R.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, C.; VÁZQUEZ-NÚFEZ, E.; DENDOOVEN, L. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil possibilities and challenges: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 18, 12-30, 2011.

FERRARO, A.; GIULIA, M.; MAZZURCO MIRITANA, V.; PANICO, A.; PONTONI, L.; RACE, M.; SILVIA, R.; SIGNORINI, A.; FABBRICINO, M.; PIROZZI, F. Bioaugmentation strategy to enhance polycyclic aromatic hydrocarbons anaerobic biodegradation in contaminated soils. *Chemosphere*. 2021 275. 130091. 10.1016/j.chemosphere.2021.130091.

GALLOTTA, F. D. C.; CHRISTENSEN, J. H. Source identification of petroleum hydrocarbons in soil and sediments from Iguazu, River Watershed, Paraná, Brazil using the CHEMSIC method (CHEMometric analysis of Selected Ion Chromatograms). *Journal of Chromatography A*. v. 1235, p. 149– 158, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967312003160>>.

GARCIA L.P.A.; GONÇALVES B.L.; PANHO G.; SCUSSEL V.M. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos: uma revisão. *Pubvet*. 8(19), 2292, 2014. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/1470/hidrocarbonetos-policiacuteclicos-aromaacuteticos-em-alimentos-uma-revisatildeo>.

GEARING, P.J.; GEARING, J.N.; PRUELL, R.J.; WADE, T.L. Partitioning of no. 2 fuel oil in controlled estuarine ecosystem, sediments and suspended particulate matter. *Environ Sci Technol*, 1980, 14:1129–1135.

GERALDO, M. R.; MARANHO, L. T. Imobilização de consórcio de bactérias degradadoras de petróleo obtidas da rizosfera de *Panicum aquaticum* poir., poaceae. *Braz. J. of Develop.* v. 6, n. 7, p.45816 – 45830, 2020. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/13066/10984>>.

GRAN-SCHEUCH, A.; FUENTES, E.; BRAVO, D. M.; JIMÉNEZ, J. C.; PÉREZ-DONOSO, J. M. Isolation and characterization of phenanthrene degrading bacteria from diesel fuel-contaminated Antarctic soils. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1634, 2017.

GRIFOLL, M.; SELIFONOV, S.A.; CHAPMAN, P.J. Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274. *Appl Environ Microbiol*. 1994 Jul;60(7):2438-49. doi: 10.1128/aem.60.7.2438-2449.1994. PMID: 8074523; PMCID: PMC201668.

HACKBUSCH S., NOIRUNGSEE N., VIAMONTE J., SUN X., BUBENHEIM P., KOSTKA J. E., MÜLLER R., LIESE A.. Influence of pressure and dispersant on oil biodegradation by a newly isolated *Rhodococcus* strain from deep-sea sediments of the gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 2020, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110683>.

HONDA, T.; KIYOZUMI, M.; KOJIMA, S. Alkyl-naphthalene. XI. Pulmonary toxicity of naphthalene, 2-methylnaphthalene and isopropylnaphthalenes in mice. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 38, 3130–3135, 1990.

HSDB (Hazardous Substances Data Bank). 2-Methylnaphthalene. The National Library of Medicine. 2002. Available on-line at: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>.

HUANG, Y.; LI, L.; YIN, X.; ZHANG, T. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) biodegradation capacity revealed by a genome-function relationship approach. *Environmental Microbiome* 18, 39 (2023). <https://doi-org.ez18.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s40793-023-00497-7>.

HUESEMANN, M.H.; HAUSMANN, T.S.; FORTMAN, T.J. Microbial factors rather than bioavailability limit the rate and extent of PAH biodegradation in aged crude oil contaminated

model soils. *Bioremediation J.* 2002, 6 (4), 321–336.
<https://doi.org/10.1080/10889860290777639-44>.

IMAM, A.; SUMAN, S.K.; GHOSH, D.K. KANAUIA, P. Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 118, 50–64, 2019.

ITOPF. Estatísticas de derramamento de petróleo. 2016. Londres. Disponível em: <http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics>.

JAHAN, R.; BODRATTI, A. M.; TSIANOU, M.; ALEXANDRIDIS, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in colloid and interface science*, 275, 102061, 2020.

JIN, J.; YAO, J.; ZHANG, Q. Biodegradation of Phenanthrene by *Pseudomonas* sp. JPN2 and Structure-Based Degrading Mechanism Study. *Bull Environ Contam Toxicol.*, 97, 689–694 2016. <https://doi-org.ez18.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00128-016-1917-1>.

JOO, H.; NDEGWA, P. M.; SHODA, M.; PHAE, C. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. *Environmental Pollution*, 156, 891–896, 2008.

JOSHI-NAVARE K.; KHANVILKAR P.; PRABHUNE A. *Jatropha* oil derived sophorolipids: production and characterization as laundry detergent additive. *Biochem. Res. Int.*, 1–11, 2013. [10.1155/2013/169797](https://doi.org/10.1155/2013/169797).

KAPOOR D.; SINGH S.; KUMAR V.; ROMERO R.; PRASAD R.; SINGH J. Regulação de enzimas antioxidantes em plantas em referência a espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). *Plant Gene.* 19:100182, 2019. <https://doi-org.ez18.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.plgene.2019.100182>.

KARLAPUDI, A.P.; VENKATESWARULU, T.; TAMMINEEDI, J.; KANUMURI, L.; RAVURU, B.K.; DIRISALA, V.R.; KODALI, V.P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution—A review. *Petroleum*, 4, 241–249, 2018.

KORSHUNOVA, T.; PICTON, B.; FURFARO, G.; MARIOTTINI, P.; PONTES, M.; PRKIĆ, J.; FLETCHER, K.; MALMBERG, K.; LUNDIN, K.; MARTYNOV, A. Multilevel fine-scale diversity challenges the ‘cryptic species’ concept. *Scientific Reports* 9, 2019, 1–23.

KRISHNAMOORTHY, D.; SELVAKUMAR, N.; DHANASEKAR, K.; WHAIPRIB, P.; MUNUSWAMY, N., Impact of January 2017 oil spill on the biota off Chennai, southeast coast

of India with emphasis on histological impact on crab, *Grapsus albolineatus*. J. Mar. Biol. Assoc. India, 59, 20–25, 2017. <https://doi.org/10.6024/jmbai.2017.59.2.1989-0>.

KWOK R.K.; MCGRATH J.A.; LOWE S.R.; ENGEL L.S.; JACKSON W.B.; CURRY M.D. Mental health indicators associated with oil spill response and clean-up: cross-sectional analysis of the GuLF STUDY cohort. Lancet Public Heal.; 2(12):e560-7, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29253441>.

LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol Rev. 1990 Sep;54(3):305-15. doi: 10.1128/mr.54.3.305-315.1990. PMID: 2215423; PMCID: PMC372779.

LI, X.; ZHAO, L.; ADAM, M. Biodegradation of marine crude oil pollution using a salt-tolerant bacterial consortium isolated from Bohai Bay, China. Mar. Pollut. Bull. 105, 43–50, 2016.

LIN, M.; HU, XIAOKE; CHEN, WEIWEI; WANG, HUI; WANG, CHUANYUAN. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation. 94. 176–181, 2014. 10.1016/j.ibiod.2014.07.011.

LIU, X. X.; HU, X.; CAO, Y.; PANG, W. J.; HUANG, J. Y.; GUO, P.; HUANG, L. Biodegradation of phenanthrene and heavy metal removal by acid-tolerant *Burkholderia fungorum* FM-2. Frontiers in Microbiology. 10, 408, 2019.

LOGESHWARAN P.; SUBASHCHANDRABOSE, S.; KRISHNAN, K.; KENDAY SIVARAM, A.; ANNAMALAI, P.; NAIDU, R.; MALLAVARAPU, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation by fenamiphos degrading *Microbacterium esteraromaticum* MM1. Environmental Technology & Innovation. 27. 2022. 102465. 10.1016/j.eti.2022.102465.

LUNDSTEDT, S. “Analysis of PAHs and their transformations products in contaminated soil and remedial processes.” (2003). Disponível em: http://www.publications.uu.se/umu/fulltext/nbn_se_umu_diva-57.pdf. Acessado em: 25/02/2023.

MALETIĆ, S.; MURENJI, S.; AGBABA, J.; RONČEVIĆ, S.; KRAGULJ ISAKOVSKI, M. Potential for anaerobic treatment of polluted sediment. J. Environ. Manag., 214, 9–16, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.029>.

MARCELINO, P.R.F.; PERES, G.F.D.; TERÁN-HILARES, R.; PAGNOCCA, F.C.; ROSA, C.A.; LACERDA, T.M. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse

hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. *Ind Crops Prod.* 2019; 129: 212 – 223 .

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Sep;56(5-6):650-63. doi: 10.1007/s002530100701. PMID: 11601610.

McGENITY, T.J.; FOLWELL, B.D.; MCKEW, B.A.; SANNI, G.O. Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquat. Biosyst.*, 8(1), 1–19, 2012.

MEDEIROS, L.C.C.; DELUNARDO, F.A.C.; SIMÕES, L.N.; PAULINO, M.G.; VARGAS, T.S.; FERNANDES, M.N.; SCHERER, R.; CHIPPARI-GOMES, A.R . Fração hidrossolúvel do petróleo induz genotoxicidade e efeitos morfológicos em robalo-peva (*Centropomus parallelus*). *Ecotoxicol. Ambiente Seguro.* 144 , 275–282, 2017.

MEDIĆ, A.; LJEŠEVIĆ, M.; INUI, H.; BEŠKOSKI, V.; KOJIĆ, I.; STOJANOVIĆ, K.; KARADŽIĆ, I. Efficient biodegradation of petroleum n -alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons by polyextremophilic *Pseudomonas aeruginosa* strain with multidegradative capacity. *RSC Advances.* 2020. 10. 14060-14070. 10.1039/C9RA10371F.

MEHETRE, G.T.; DASTAGER, S.G.; DHARNE, M.S. Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. *Sci Total Environ.* 2019 Aug 20;679:52-60. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.376. Epub 2019 May 7. PMID: 31082602.

MEHRDAD S., SAEB K., TAGHAVI L., GHANE M. Evaluation of the Biodegradation of Petroleum Contaminants by *Pseudomonas aeruginosa* in the Caspian Sea Coastline Waters. *Iranian Journal of Toxicology.* 13(3), 21-26, 2019.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198-2004.

NEFF, J. M.; LEE, K.; DE BLOIS, E.M. Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water. 2002, 241-313.

NIKOLOPOULOU, M.; PASADAKIS, N.; KALOGERAKIS, N. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. *Mar. Pollut. Bull.*, 72, 165–173, 2013.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*. 25(5), 772–776, 2002.

ODUM, E. P. *Ecologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 434 p.

OHIOZEBAU, E.; TENDLER, B.; CODLING, G.; KELLY, E.; GIESY, J.P.; JONES, P.D. Potential health risks posed by polycyclic aromatic hydrocarbons in muscle tissues of fishes from the Athabasca and Slave Rivers, Canada. *Environ. Geochem. Health* 39, 2017, 139–160. <https://doi.org/10.1007/s10653-016-9815-3>.

OSTENDORF, T. A.; SILVA, I. A.; CONVERTI, A.; SARUBBO, L. A. Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater. *Journal of biotechnology*, 295, 71-79, 2019.

ÖZDEMİR G.; PEKER S.; HELVACI S. S. Effect of pH on the Surface and Interfacial Behavior of Rhamnolipids R1 and R2. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 234, 135-143, 2014.

PACWA-PŁOCINICZAK, M., PŁAZA, G. A., PIOTROWSKA-SEGET, Z., CAMEOTRA, S. S., Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 633–654, 2011.

PASQUEVITCH, M.; DREON, M.; RIVERA, J.G.; BOUCARD, C.V.; HERAS, H. Efeito de hidrocarbonetos de petróleo bruto na expressão de proteínas do camarão *Macrobrachium borellii*. *Comp. Bioquim. Physiol. Parte C Toxicol. Pharmacol.*, 157, 390–396, 2013.

PENG, R. H.; XIONG, A. S.; XUE, Y.; FU, X. Y.; GAO, F.; ZHAO, W.; YAO, Q. H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS — Microbiology Reviews*, 32, 927-955, 2008.

PERDIGÃO, R.; ALMEIDA, C.M.R.; SANTOS, F.; CARVALHO, M.F.; MUCHA, A.P. Optimization of an Autochthonous Bacterial Consortium Obtained from Beach Sediments for Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons. *Water*, 13, 66, 2021.

PERELO, L.W. Review: in situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J.Hazard.Mater.*, 177(1–3), 81–89, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.090>.

PERFUMO, A; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. *Trends in Biotechnology*, 36(3), 277-289, 2018.

PETERSON, C. H.; RICE, S. D.; SHORT, J. W.; ESLER, D.; BODKI, J. L.; BALLACHEY, B. E.; IRONS, D. B. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science*, 302, 2082–2086, 2003.

PINO-HERRERA, D.O.; PECHAUD, Y.; HUGUENOT, D.; ESPOSITO, G.; VAN HULLEBUSCH, E.D. Removal mechanisms in aerobic slurry bioreactors for remediation of soils and sediments polluted with hydrophobic organic compounds: an overview. *J.Hazard.Mater.*, 339, 427–449, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.013>.

PRARTONO, T.; DWINOVANTYO, A.; SYAFRIZAL, S.; SYAKTI, A.D. Potential Use of Deep-Sea Sediment Bacteria for Oil Spill Biodegradation: A Laboratory Simulation. *Microorganisms*, 10, 1616, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081616>.

PRIYA, A.; MANAB SARMA, P.; LAL, B. Isolation and characterization of *Candida vishwanathii* strain TERI MS1 for degradation of petroleum hydrocarbons in marine environment. *Desalination Water Treat.*, 57, 22099–22106, 2016.

RAINHA, K.P.; AMORIM, J.L.; SENNA, J.N.; FERREIRA, S.A.D.; OLIVEIRA, L.M.S.L.; GUIMARÃES, R.C.L. 57° CBQ – Estudo de intemperismo de petróleo para minimizar impactos ambientais. 57° Congresso Brasileiro de Química. 2017. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2017/trabalhos/5/11739-24886.html>.

REHMAN, A.; RAZA, Z. A.; SAIF-UR-REHMAN. Synthesis and use of self-assembled rhamnolipid microtubules as templates for gold nanoparticles assembly to form gold microstructures. *Journal of Colloid and Interface Science*. 347(2), 332–335, 2010.

RESNICK, S.M.; GIBSON, D.T. Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Appl Environ Microbiol.* 1996 Nov;62(11):4073-80. doi: 10.1128/aem.62.11.4073-4080.1996. PMID: 8899998; PMCID: PMC168229.

RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology Progress*, 36(5), e3030, 2020.

ROCCHETTI, L.; BEOLCHINI, F.; HALLBERG, K.B.; JOHNSON, D.B.; DELL'ANNO, A. Effects of prokaryotic diversity changes on hydrocarbon degradation rates and metal partitioning during bioremediation of contaminated anoxic marine sediments. *Mar.Pollut.Bull.*, 64 (8), 1688–1698, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.05.038>.

SADEGHBEIGI, R. Chapter 3—FCC Feed Characterization. In *Fluid Catalytic Cracking Handbook*, 3rd ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, UK, 2012.

SAJNA K. V.; SUKUMARAN R. K.; JAYAMURTHY H.; REDDY K. K.; KANJILAL S.; PRASAD R. B.; PANDEY A. Studies on Biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 and Their Potential Application as Laundry Detergent Additives. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 85-92, 2013.

SANTOS, A.; SILVA, M.; COSTA, E.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; RAMOS, C. S.; PORTO, A. Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2017. 51(2), 6657.

SANTOS, D.K.F.; BRANDÃO, Y.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SALGUEIRO, A.A.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica* Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 3, n. 3, p. 48-57, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.004>.

SARUBBO, L. A.; MARIA DA GLORIA, C. S.; DURVAL, I. J. B.; BEZERRA, K. G. O.; RIBEIRO, B. G.; SILVA, I. A.; BANAT, I. M. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, 108377, 2022.

SCHIRMER, A.; RUDE, M.A.; LI, X.; POPOVA, E.; CARDAYRE, S.B.D. Microbial Biosynthesis of Alkanes. *Science*. 329, 559–562, 2010.

SCHMIDT-ETKIN, D. Ocorrências de derramamento: Uma visão geral mundial. Em *Ciência e Tecnologia de Derramamento de Petróleo*; Elsevier: Amsterdã, Holanda, p. 7–48, 2011.

SINGH, R.; GLICK, B. R.; RATHORE, D. Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: A review. *Pedosphere*, 28(2), 170-189, 2018.

SKOWROŃ J.: 2-Methylnaphtalene. Documentation of maximum admissible values for occupational exposure. *Podst Met Oceny Srod Pr*; 22(47), 185–204, 2006.

SOBRINHO, H. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; PORTO, A. L. F.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: classification, properties and environmental applications. *Recent Developments in Biotechnology*, 11(14), 1-29, 2013.

SOUZA, A. R. Remediação de solo contaminado com fenantreno utilizando persulfato de sódio ativado por método inovador. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2016.

SOUZA, E. C.; VESSONI-PENNA, T. C.; DE SOUZA O. R. P. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 88-94, 2014.

SUN, Q.; WANG, N.; YU, J. Advances in Catalytic Applications of Zeolite-Supported Metal Catalysts. *Adv. Mater.* 2021, 33, 2104442. <https://doi.org/10.1002/adma.202104442>

TISSOT, B.P.; WELTE, D.H. Composition of crude oils. In *Petroleum Formation and Occurrence*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany; Chapter 1; 333–368, 1984.

USMAN, M.; HANNA, K.; FAURE, P. Remediation of oil-contaminated harbor sediments by chemical oxidation. *Sci. Total Environ.*, 634, 1100–1107, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.092>.

VAN BEILEN, J.B.; PANKE, S.; LUCCHINI, S.; FRANCHINI, A.G.; RÖTHLISBERGER, M.; WITHOLT, B. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology (Reading)*. 2001 Jun;147(Pt 6):1621-1630. doi: 10.1099/00221287-147-6-1621. PMID: 11390693.

VARJANI S.; UPASANI V.N. Bioaugmentation of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514—a novel oily waste degrader for treatment of petroleum hydrocarbons. *Bioresour Technol.*, 319:124240, 2021.

VARJANI, S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour. Technol.*, 223, 277–286, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>.

VASCONCELOS, I.U.; FRANÇA, F.P.D.; OLIVEIRA, F.J.S. Removal of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *Química Nova*, 34, 218–221, 2011.

VIDALI, M. Bioremediation: An overview. *Journal of Applied Chemistry*, 73 (7), 2001, pp. 1163-1172.

WADE, T. L.; QUINN, J.G. Incorporation, distribution and fate of saturated petroleum hydrocarbons in sediments from a controlled marine ecosystem. 1980, 3(1), 15–33. doi:10.1016/0141-1136(80)90033-1.

WARSHAWSKY, D. Polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons. In: Patty's Toxicology, 5th edition, Vol. 4. Bingham, E; Cohrssen, B; Powell, CH, eds. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY. 2001.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, p. 146-154, 2005.

WHITE, N.D.; GODARD-CODDING, C.; WEBB, S.J.; BOSSART, G.D.; FAIR, P.A. Immunotoxic effects of in vitro exposure of dolphin lymphocytes to Louisiana Sweet crude oil and Corexit™. *J. Appl. Toxicol.* 37, 676–682, 2017. <https://doi.org/10.1002/jat.3414>.

XU X.; LIU W.; TIAN S.; WANG W.; QI Q.; JIANG P.; GAO X.; LI F.; LI H.; YU H. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Front Microbiol.*, 9, 2885, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.02885. PMID: 30559725; PMCID: PMC6287552.

XU, M.; WU, M.; ZHANG, Y.; LIU, W.; CHEN, G.; XIONG, G.; GUO, L. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial mixture. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 19, 3833–3844 (2022). <https://doi-org.ez18.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13762-021-03284-4>.

XUEQING ZHU, A.D.V.; MAKRAM, T.; LEE, S.K. Guidelines for the Bioremediation of Marine Shorelines and Freshwater Wetlands; 23; U.S. Environmental Protection Agency: Cincinnati, OH, USA, 2001.

YAMADA, K.; LIM, J.; DALE, J.M.; CHEN, H.; SHINN, P.; PALM, C.J.; SOUTHWICK, A.M.; WU, H.C.; KIM, C.; NGUYEN, M.; PHAM, P.; CHEUK, R. Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. *Science*. 2003 Oct 31;302(5646):842-6. doi: 10.1126/science.1088305. PMID: 14593172.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol Methods*. 2004 Mar;56(3):339-47. doi: 10.1016/j.mimet.2003.11.001. PMID: 14967225.

ZAKARIA, M.P.; BONG, C.-W.; VAEZZADEH, V. Fingerprinting of petroleum hydrocarbons in malaysia using environmental forensic techniques: A 20-year field data

review. In *Oil Spill Environmental Forensics Case Studies*; Butterworth-Heinemann: Oxford, UK, Chapter 16; 345–372, 2018.

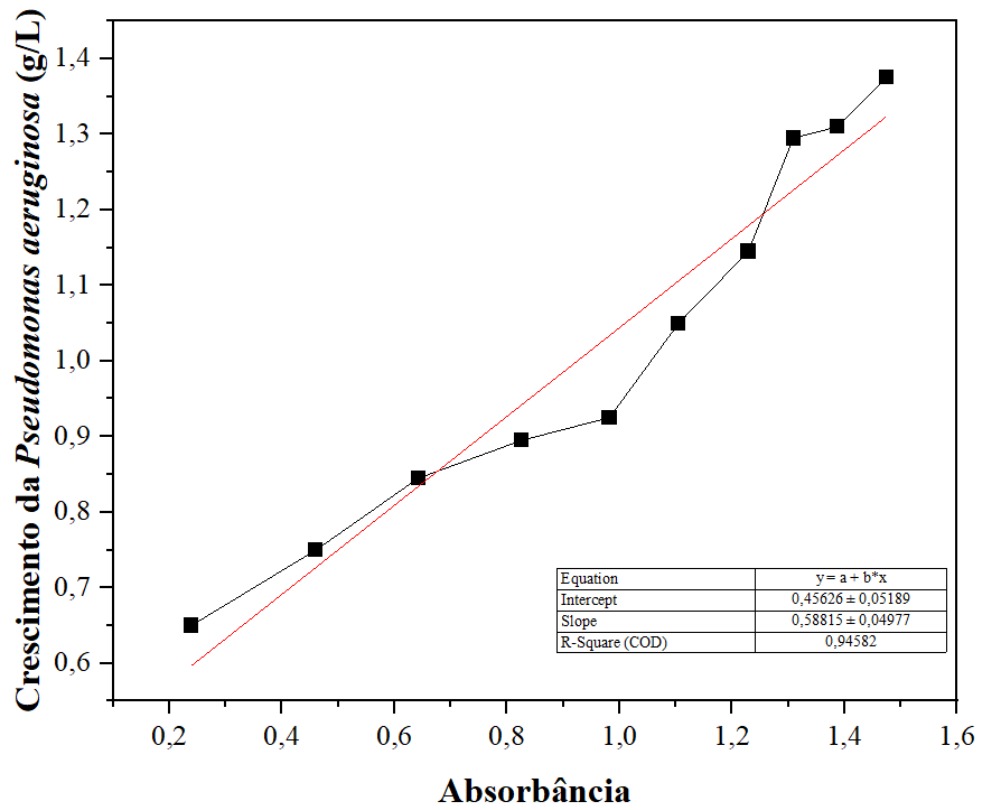
ZHANG, Z.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C.; TAO, F.; XU, P. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresour Technol.* 2011 Mar;102(5):4111-6. doi: 10.1016/j.biortech.2010.12.064. Epub 2010 Dec 22. PMID: 21227683.

MARTIRANI-VON ABERCRON, S-M.; PACHECO, D.; BENITO-SANTANO, P.; MARÍN, P.; MARQUÉS, S. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Changes in Bacterial Community Structure under Anoxic Nitrate Reducing Conditions. *Front. Microbiol.* 2016, 7:1775. doi: 10.3389/fmicb.2016.01775

APÊNDICE

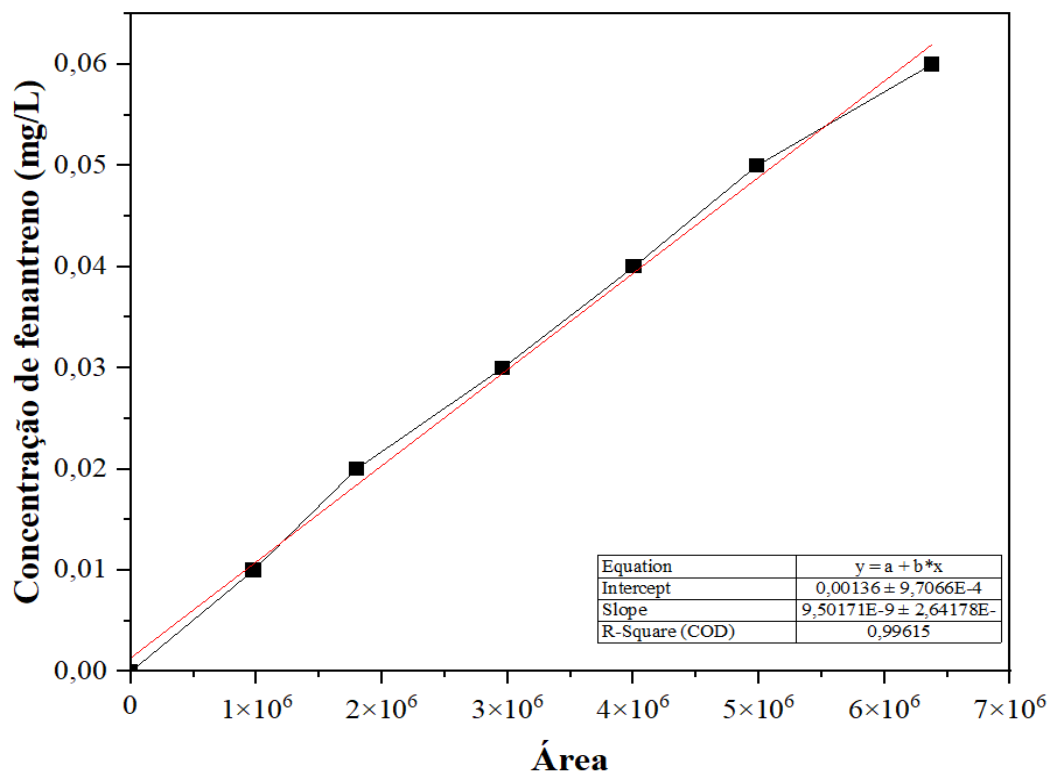
APÊNDICE I

Curva de calibração da quantificação do crescimento microbiano da *Pseudomonas aeruginosa*
AP029 VIIA



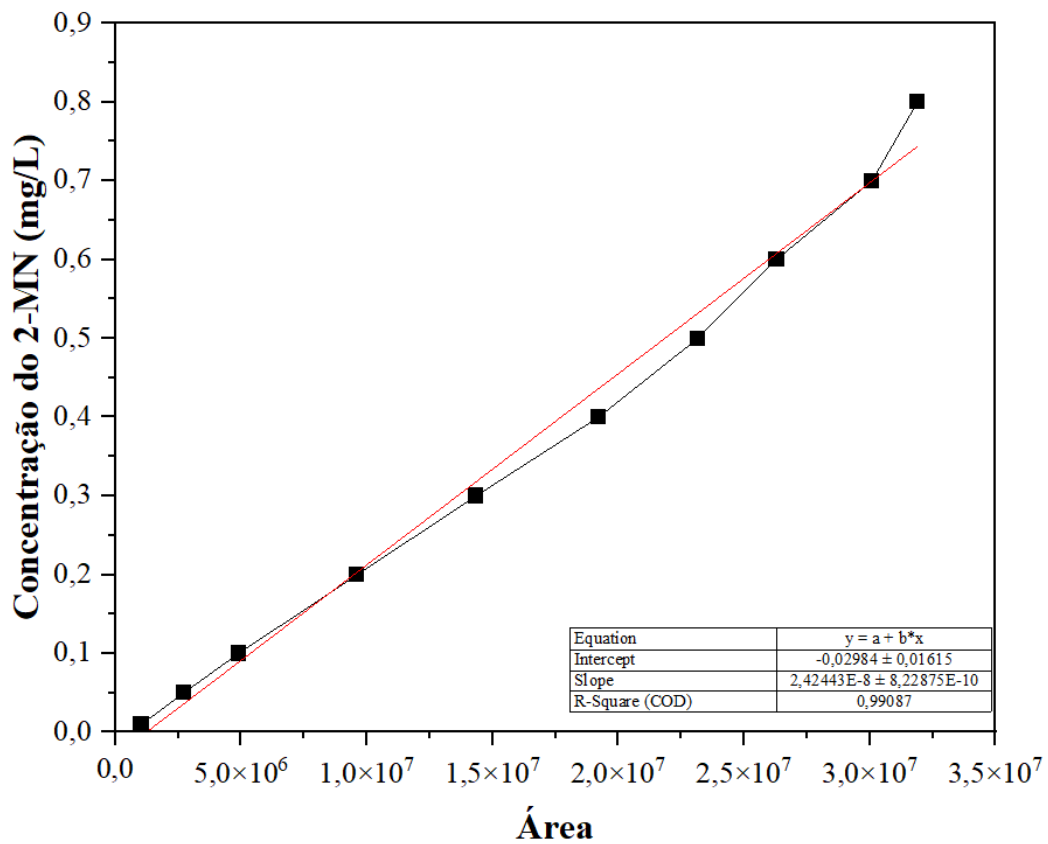
APÊNDICE II

Curva de calibração para quantificar a concentração do fenantreno (mg/L)



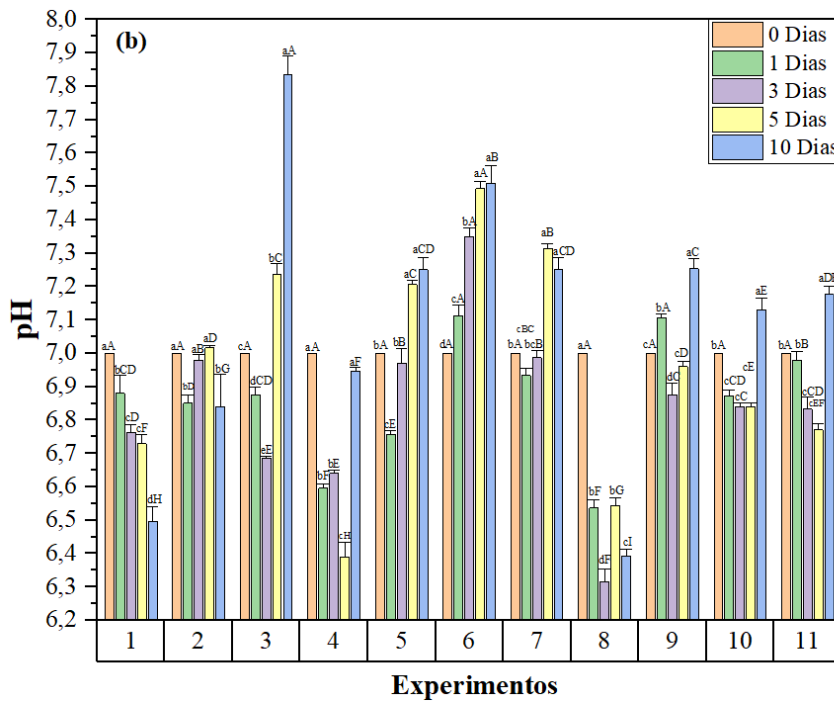
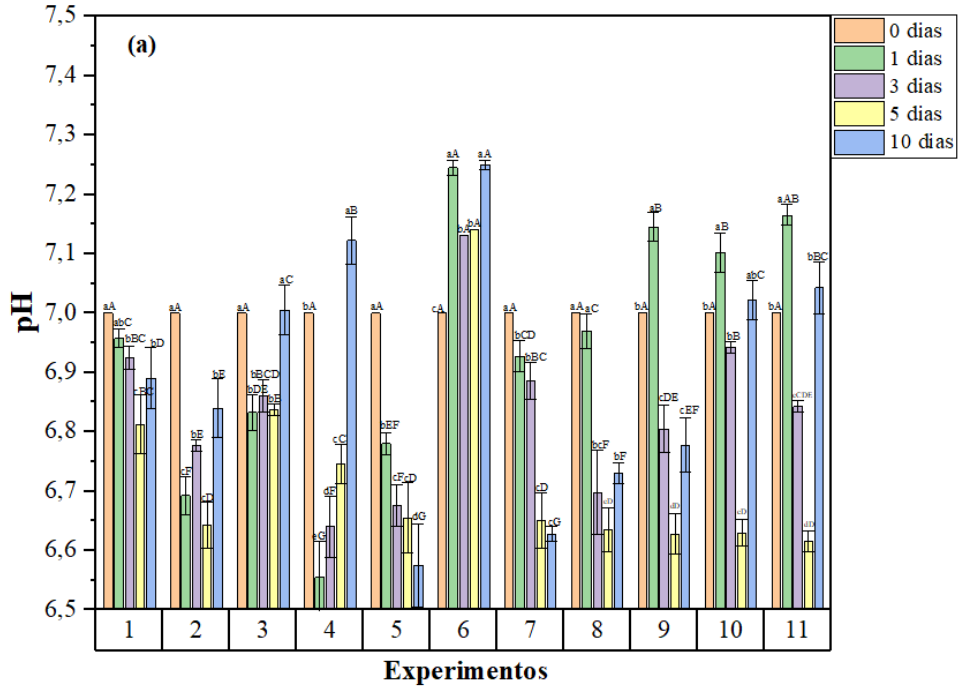
APÊNDICE III

Curva de calibração para quantificar a concentração do 2-MN (mg/L)



APÊNDICE IV

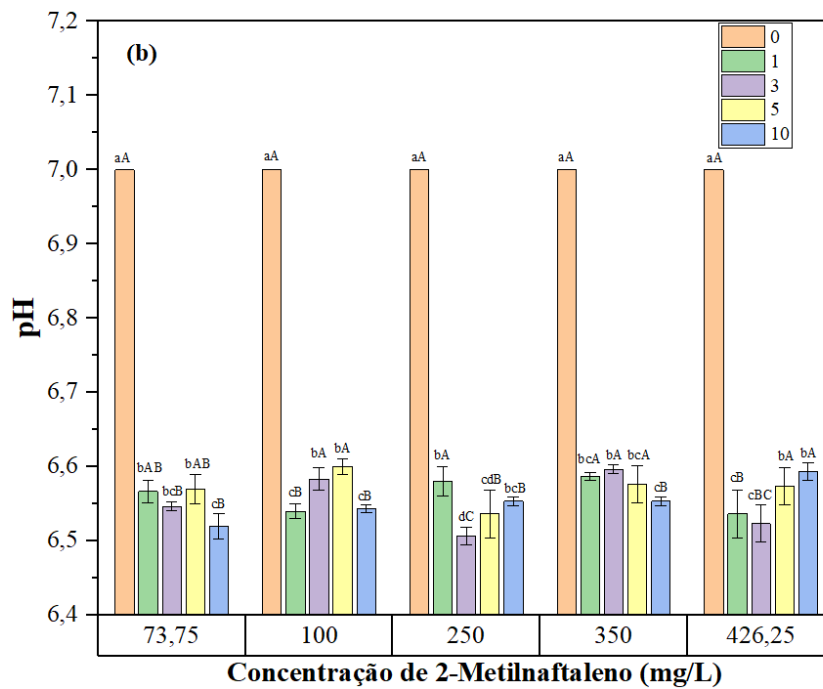
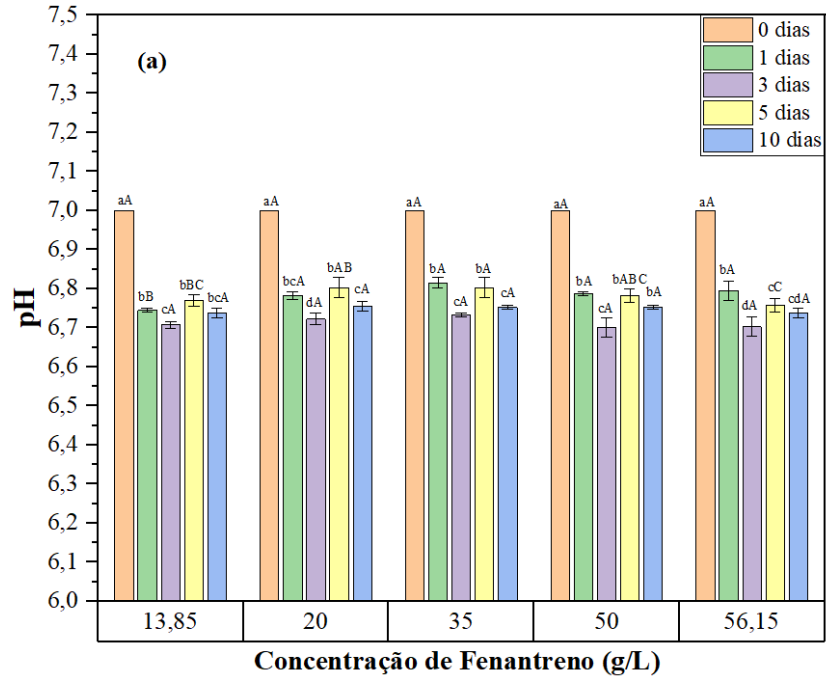
Valores de pH para a degradação do Fenantreno (a) e do 2-MN (b) durante os dez dias de degradação na presença do biossurfactante.



*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula entre os experimentos, para cada tempo, não apresentam diferença estatística entre si. ** Valores seguidos pela mesma letra minúscula dentro do mesmo experimento não apresentam diferença estatística entre si.

APÊNDICE V

Valores de pH para as 5 concentrações do Fenantreno (a) e 2-MN (b) estudadas sem a adição do biossurfactante, durante os 10 dias de degradação



*Valores seguidos pela mesma letra maiúscula entre os experimentos, para cada tempo, não apresentam diferença estatística entre si. ** Valores seguidos pela mesma letra minúscula dentro do mesmo experimento não apresentam diferença estatística entre si.