PROGRAMA EQ-ANP

Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural

Emprego de *Yarrowia lipolytica* na degradação de óleo cru

Tatiana Felix Ferreira

Dissertação de Mestrado

Orientador(es)
Prof.ª Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
Prof.ª Maria Helena Miguez da Rocha-Leão, D.Sc.

Abril de 2009

EMPREGO DE *Yarrowia lipolytica* NA DEGRADAÇÃO DE ÓELO CRU

Tatiana Felix Ferreira

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado por:

_____
Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
(orientador)

_____
Maria Helena Miguez da Rocha-Leão, D.Sc.
(orientador – presidente da banca)

_____
Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

_____
Vania Margaret Flosi Paschoalin, D.Sc.

_____
Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Abril de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Tatiana Felix

Emprego de *Yarrowia lipolytica* na degradação de óleo cru / Tatiana Felix Ferreira. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2009.

xv, 122 p.

(Dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2009.

Orientador(es): Maria Alice Zarur Coelho e Maria Helena Miguez da Rocha-Leão.

1. Petróleo. 2. *Yarrowia lipolytica*. 3. Parede celular. 4. Tese. (Mestrado – UFRJ/EQ). 5. Maria Alice Zarur Coelho e Maria Helena Miguez da Rocha-Leão.

I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais, Déa e Márcio.
Obrigada por existirem. Amo vocês!

“Nenhum homem realmente produtivo pensa como se estivesse escrevendo uma dissertação”

Albert Einstein.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Déa e Márcio, por todo amor, apoio e incentivo e pela educação que me foi dada, pois sem esta seria impossível completar mais essa etapa.

Aos meus queridos irmãos, Leandro e Leonardo, pelo carinho e respeito principalmente nos momentos mais críticos (Juma!!!).

As minhas amigas e irmãs, que apesar de distantes sei que estão sempre torcendo por mim.

À querida prima e amiga Fernanda, por estar comigo no momento que mais precisei. Agradeço pela ajuda nos experimentos e pela calma e paciência mesmo quando tudo parecia perdido.

Ao meu namorado, Diego, pelo seu amor, carinho e apoio. Pelo seu companheirismo, que muitas vezes o levou ao Fundão aos domingos para tirar ponto dos experimentos junto comigo. Por compreender os momentos em que precisei me ausentar e os momentos em que precisei ficar sozinha.

As minhas amigas Ariana e Roberta, pela paciência e amizade. À Ariana, pelas idas ao shopping e pelos passeios noturnos quando necessário. À Roberta, pelos vinhos e pelos momentos divertidos que muito me ajudaram a relaxar. As duas, por compreenderem e respeitarem meus momentos de Juma.

Agradeço às minhas orientadoras que muito tem contribuído para minha formação científica.

À Maria Alice, pela confiança depositada em mim e por estar sempre disposta a ajudar.

À Maria Helena, pelos ensinamentos e experiência transmitidos, os quais foram essenciais para realização deste trabalho.

Ao Professor Márcio Nele por disponibilizar os equipamentos do Laboratório de Sistemas Particulados (EQ/UFRJ). E ao pessoal do laboratório, principalmente ao Anderson, sempre disposto a ajudar.

Ao professor Leonardo Andrade por disponibilizar os materiais e equipamentos do Laboratório de Biomineralização (CCS/UFRJ).

A Professora Débora Almeida por disponibilizar os experimentos do Laboratório LADETEC e pela paciência e ajuda na interpretação dos resultados de CG-MS (IQ/UFRJ). E ao pessoal do laboratório, principalmente ao Rafael, por me ajudar nas análises.

Agradeço à empresa Subsea 7 do Brasil, em especial, ao engenheiro Vitor Hugo, por ter fornecido amostras de água coletadas de alto mar.

À turma do Laboratório 103 e anexo (Laboratório 124): Ariana, Kelly, Roberta, Diego, Etel, Lívia, André, Carlos André, Rafael, Mariana, Natasha, Ana Claudia, Bernardo, Ana Iraidy, Luiza, Michele, Fernanda, Vanessa, Emanuel, Thiana, Giselle, pela ajuda e amizade. Em especial, à PROFESSORA Piscilla Amaral com quem a convivência diária não só me incentiva pelo exemplo que és como também contribui com seus conhecimentos.

Agradeço também à querida Alzirene Rodrigues, mais conhecida como Zizi, por estar sempre disposta a ajudar. Obrigada!

Agradeço o apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo – ANP – e da Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCT, em particular ao PRH 13, da Escola de Química - Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências, com ênfase na área de Petróleo e Gás Natural.

EMPREGO DE *Yarrowia lipolytica* NA DEGRADAÇÃO DE ÓLEO CRU

Tatiana Felix Ferreira

Abril, 2009

Orientadores: Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
Prof. Maria Helena Miguez da Rocha-Leão, D.Sc.

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbia particularmente adaptada a substratos hidrofóbicos. A afinidade por estes substratos se dá devido à elevada hidrofobicidade celular apresentada por esta espécie. Neste trabalho, foi avaliada a capacidade biodegradadora de uma cepa de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, isolada da Baía de Guanabara (RJ-Brasil). Realizou-se um planejamento experimental fatorial completo 2^4 a fim de estudar a influência das variáveis temperatura, agitação, concentração do inóculo e concentração inicial de petróleo na biodegradação de óleo cru. Além disso, análises de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas de amostras de óleo antes e após o processo de biorremediação foram realizadas para investigar quais grupos de compostos presentes no óleo cru a cepa em questão é capaz de assimilar. *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 mostrou ser um microrganismo com potencial para aplicação em processos de biorremediação, sendo capaz de consumir *n*-parafinas, isoprenóides e até hidrocarbonetos aromáticos como a classe dos naftalenos e a classe dos fenantrenos. Todas as variáveis estudadas apresentaram efeitos significativos sobre o processo de biodegradação de óleo cru, sendo que as variáveis temperatura, agitação e concentração do inóculo apresentaram efeito positivo e a concentração inicial de petróleo efeito negativo. Em paralelo, foi investigada a hidrofobicidade celular de *Y. lipolytica* perante diferentes substratos. Os substratos utilizados foram glicose, glicerol e petróleo. A hidrofobicidade celular não foi alterada pela fonte de carbono presente no meio de cultivo. Contudo, a fonte de carbono parece alterar a composição da parede celular, e conseqüentemente, influencia os componentes responsáveis pela hidrofobicidade da célula. Com isso, investigou-se o envolvimento das proteínas e dos

polissacarídeos no fenômeno da hidrofobicidade. As proteínas parecem estar diretamente ligadas ao elevado caráter hidrofóbico apresentado pela cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.

Abstract of a Dissertation presented to Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - EQ/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science with emphasis on Petroleum and Natural Gas.

EMPLOYMENT OF *Yarrowia lipolytica* IN CRUDE OIL DEGRADATION

Tatiana Felix Ferreira

Abril, 2009

Supervisors: Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
Prof. Maria Helena Miguez da Rocha-Leão, D.Sc.

Yarrowia lipolytica is an unique strictly aerobic yeast with the ability to degrade very efficiently hydrophobic substrates. The cell surface of this specie presents high hydrophobicity what justified its affinity for hydrophobic substrates. In the present work, the degrading potential of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, isolated from tropical estuarine water in Rio de Janeiro (Brazil), is evaluated. A 2^4 full factorial design was used to investigated the influence of some variables (temperature, agitation, initial cell concentration and initial petroleum concentration) on biodegradation of crude oil. Additionally, analysis of gas chromatography acoplated to mass spectrometry was performed to investigate the groups of compounds present in the crude oil that can be assimilated by this strain. The results showed that *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 is a microorganism with potential application at bioremediation process, being capable to consume n-alkanes, isoprenoids and aromatic hydrocarbons as the group of naphthalenes and the group of phenanthrene. All variables studied presented significant effects by biodegradation process of crude oil. The temperature, agitation and initial cell concentration presented positive effect and the initial petroleum concentration presented negative effects. In parallel, cell hidrofobicity of *Y. lipolytica* at different substrates was evaluated. The substrates used were glucose, glycerol and petroleum. Cell hidrofobicity was not modified by the carbon source present at the growth medium. However, carbon source modifies the cell wall composition, and consequently, influences the components responsible for cell hidrofobicity. With that, the involvement of proteins and polysaccharides at phenomenon of cell hidrofobicity was investigated. Proteins appear

to be directly responsible for high hydrophobic character presented by *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO **1**

II. OBJETIVOS **4**

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **5**

III.1. PETRÓLEO 5
III.1.1. Constituintes do petróleo *6*
III.1.2. Classificação do Petróleo *12*
III.1.3. Petróleo e o Meio Ambiente *15*
III.2. BIORREMEDIAÇÃO 31
III.2.1. As vantagens da Biorremediação *32*
III.3. *YARROWIA LIPOLYTICA* 37
III.3.1. Consumo de substratos hidrofóbicos *38*
III.3.2. A superfície celular *40*
III.3.3. A produção de biossurfactante *42*
III.3.4. Aplicação de Y. lipolytica em processos de biorremedição *43*
III.3.5. Consumo de glicerol por Y. lipolytica *44*

IV. MATERIAIS E MÉTODOS **46**

IV.1. MATERIAIS 46
IV.2. EQUIPAMENTOS 46
IV.3. MEIOS DE CULTIVO 47
IV.4. MICRORGANISMOS 48
IV.5. MANUTENÇÃO DA CULTURA 49
IV.6. OBTENÇÃO DO INÓCULO 49
IV.7. EXPERIMENTOS PRELIMINARES 49
IV.8. ESTUDO DE VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO 50
IV.9. CRESCIMENTO DE *Y. LIPOLYTICA* EM GLICEROL 52
IV.10. EXPERIMENTOS CONTROLE 52
IV.11. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE CELULAR DE *YARROWIA LIPOLYTICA* 53
IV.11.1. Determinação do Crescimento Celular *53*
IV.11.2. Estudo da influência de polissacarídeos e proteínas na hidrofobicidade celular *53*
IV.12. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO NA HIDROFOBICIDADE CELULAR 55
IV.13. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA 56
IV.14. AMOSTRAGEM 56
IV.15. MÉTODOS ANALÍTICOS 57
IV.15.1. Quantificação do Crescimento Celular *57*
IV.15.2. Determinação da concentração de glicose *58*
IV.15.3. Determinação da concentração de óleo cru *58*
IV.15.4. Determinação da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) *60*
IV.15.5. Determinação do pH do meio de cultivo *61*
IV.15.6. Determinação da concentração de glicerol *61*
IV.15.7. Teste MATS (microbial adhesion to solvents – adesão microbiana à solventes) *62*
IV.15.8. Determinação da produção de biosurfactante *63*
IV.15.9. Determinação do teor de proteína *64*
IV.15.10. Cromatografia gasosa *65*
IV.15.11. Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas *66*
IV.15.12. Microscopia Eletrônica de Transmissão *67*

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO **69**

V.1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES 69
V.2. ESTUDO DAS VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO 75
V.3. POTENCIAL DEGRADADOR DE *Y. LIPOLYTICA* 87
V.4. CRESCIMENTO DE *Y. LIPOLYTICA* EM GLICEROL 98
V.5. CARACTERIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE *Y. LIPOLYTICA* 101
V.6. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO NA HIDROFOBICIDADE CELULAR 109

VI. CONCLUSÕES **113**
VII. SUGESTÕES **115**
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **116**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura V.1. Perfil de crescimento de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em água do mar contendo 1%v/v de petróleo. 69
Figura V.2. Perfil de crescimento celular e consumo de glicose de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em (A) água do mar com glicose 2% e em (B) água do mar com glicose 2% e petróleo 1%v/v. 70
Figura V.3. Experimentos preliminares (A) 1, (B) 2 e (C) 3 após 120 horas. 73
Figura V.4. Cromatograma de CG/DIC do (A) óleo cru (Marlin) (B) óleo remanescente no ensaio controle e (C) óleo remanescente no experimento 1. 74
Figura V.5. Diagrama de Pareto gerado pelo Statistica 7.0 para analisar as variáveis que influenciam na biodegradação. 77
Figura V.6. Coeficientes de regressão no planejamento fatorial completo para remoção de óleo cru por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682. 80
Figura V.7. Superfície de resposta da variável dependente remoção de petróleo em relação à agitação e temperatura. 81
Figura V.8. Curva de contorno da remoção de petróleo em relação à agitação e temperatura. 82
Figura V.9. Diagrama de Pareto gerado pelo Statistica 7.0 para analisar as variáveis que influenciam na produção de biossurfactante. 84
Figura V.10. Efeitos progressivos do nível de biodegradação sobre a composição dos óleos em função da intensidade da alteração em uma escala de 1 (leve) a 10 (severa) (TAMANQUEIRA, 2006). 88
Figura V.11. Cromatogramas de íons totais do óleo cru remanescente no (A) ensaio controle abiótico e no (B) ensaio 20. 89
Figura V.12. Fragmentogramas m/z 85 do óleo cru remanescente no (A) ensaio controle abiótico, (B) no ensaio 20 e no (C) ensaio 21. 91
Figura V.13. Fragmentogramas m/z 191 do óleo cru remanescente no (A) ensaio controle abiótico, (B) no ensaio 20 e no (C) ensaio 21. 93
Figura V.14. Fragmentogramas m/z 128, m/z 142, m/z 156 e m/z 170 do óleo cru remanescente no (A) ensaio controle abiótico, (B) no ensaio 20 e no (C) ensaio 21. 95
Figura V.15. Fragmentogramas m/z 178, m/z 192 e m/z 206 do óleo cru remanescente no (A) ensaio controle abiótico, (B) no ensaio 20 e no (C) ensaio 21. 97
Figura V.16. Perfil de crescimento celular e consumo de glicerol de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo glicerol 2%. 98
Figura V.17. Perfil de crescimento celular e consumo de glicerol de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo glicerol 2% e petróleo 1%. 100
Figura V.18. Hidrofobicidade da superfície celular obtida pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm e tratadas com pronase. 103
Figura V.19. Microscopia eletrônica de transmissão de (A) células integras e (B) células tratadas com pronase. 104
Figura V.20. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm e tratadas com amiloglucosidase. 106
Figura V 21. Microscopia eletrônica de transmissão de (A) células integras e (B) células tratadas com amiloglucosidase. 107
Figura V.22. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio contendo glicerol e em meio contendo petróleo e tratadas com pronase. 110
Figura V.23. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio contendo glicerol e em meio contendo petróleo e tratadas com amiloglucosidase. 111

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela V.1. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia no início e no final do crescimento de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em água do mar contendo 1%v/v de óleo cru. 70
Tabela V.2. Tensão superficial dos meios de cultivo no início e no final dos experimentos preliminares. 71
Tabela V.3. Porcentagem de remoção de petróleo analisado por espectrofotometria nos experimentos preliminares 1 e 3. 72
Tabela V.4. Ensaios do planejamento fatorial completo 2^4 e resultados de remoção do óleo e produção de biosurfactante. 76
Tabela V.5. Efeitos das variáveis no planejamento fatorial completo para remoção de óleo cru por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682. 78
Tabela V.6. Análise da variância no planejamento fatorial completo para remoção de óleo cru por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682. 80
Tabela V.7. Efeitos das variáveis no planejamento fatorial completo para produção de biossurfactante por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682. 84
Tabela V.8. Coeficientes de regressão no planejamento fatorial completo para produção de biossurfactante por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682. 86
Tabela V.9. Análise da variância no planejamento fatorial completo para produção de biossurfactante por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682. 87
Tabela V.10. Tensão superficial do meio mineral contendo 2% de glicerol no início e no final do experimento. 99
Tabela V.11. pH do meio mineral contendo 2% de glicerol no início e no final do experimento. 99
Tabela V.12. Hidrofobicidade detectada pelo teste MATS para duas cepas de *Y. lipolytica* e para uma cepa de *S. cerevisiae* crescidas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm. 102
Tabela V.13. Quantidade de proteína obtida pelo método de Lowry (1951) da solução de pronase utilizada e do sobrenadante da reação enzimática com pronase de *Y. lipolytica* cultivadas em YPD. 103
Tabela V.14. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD antes e após incubação a 37ºC por 24 horas. 105
Tabela V.15. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD após incubação a 65°C por 30 minutos, 57°C por 2 horas e 37°C por 22 horas. 106
Tabela V.16. Quantidade de glicose livre dada pelo método da glicose oxidase do sobrenadante da reação enzimática com amiloglucosidase de *Y. lipolytica* cultivadas em YPD. 107
Tabela V.17. Hidrofobicidade detectada pelo teste MATS para cepas de *Y. lipolytica* crescendo em meio contendo diferentes fontes de carbono. 109
Tabela V.18. Quantidade de proteína dada pelo método de Lowry da solução do sobrenadante da reação enzimática com pronase de *Y. lipolytica* cultivadas em meio contendo glicerol e em meio contendo petróleo. 110
Tabela V.19. Quantidade de glicose livre dada pelo método da glicose oxidase do sobrenadante da reação enzimática com amiloglucosidase de *Y. lipolytica* cultivadas em meio contendo glicerol e em meio contendo petróleo. 111

I. INTRODUÇÃO

Considerada a maior reserva petrolífera da Plataforma Continental Brasileira, a Bacia de Campos tem cerca de 100 mil quilômetros quadrados e se estende do estado do Espírito Santo nas imediações da cidade de Vitória, até Arraial do Cabo, no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro. Atualmente é responsável por aproximadamente 84% da produção nacional de petróleo (PETROBRAS).

Em 2007, a Bacia de Campos completou 30 anos de produção e abriga cerca de 80% das reservas de petróleo já descobertas pela Petrobras no Brasil. Hoje em dia são extraídos diariamente cerca de 1,49 milhão de barris de óleo e as previsões para 2010 é que a produção aumente para 1,8 milhão de barris de óleo por dia (PETROBRAS).

Uma das características da produção da Bacia de Campos é ser executada totalmente *offshore*, através de 37 sistemas de produção distribuídos entre plataformas fixas (12), flutuantes (12) e navios adaptados (13). O escoamento dessa produção é realizado por oleodutos (20%) e por navios (80%). Essas atividades expõem a região a um risco potencial de acidentes, com vazamentos de óleo, possibilitando a contaminação de ambientes costeiros como praias e manguezais. Esse tipo de catástrofe, além do dano ao meio ambiente, pode vir a causar graves impactos na imagem das companhias produtoras de petróleo (PETROBRAS).

Entre as várias técnicas de controle de derramamentos incluem-se métodos físicos e químicos, como barreiras de contenção, aparelhos de sucção e uso de jatos de água para dispersar o óleo, ou a utilização de absorventes, dispersantes, precipitantes e gelificantes. As barreiras de contenção e os aparelhos de sucção são eficientes em águas calmas onde a ondulação não compromete essas técnicas. A queima do óleo cru no mar, outra das alternativas possíveis, não é considerada um tratamento satisfatório, pois pode ser prejudicial à fauna e flora marinhas. De todas as técnicas, apenas as de precipitação e dispersão têm sucesso aparente em alto mar. Os dispersantes químicos fazem com que o óleo se espalhe de modo muito rápido, tornando-o menos "visível". Neste caso, apesar do material continuar no ambiente, é mais facilmente degradado por processos biológicos (biodegradação), uma vez que a dispersão facilita o contato com os microrganismos. Contudo, maioria dos dispersantes atualmente utilizados são tóxicos

para o meio ambiente, não são biodegradáveis e sua acumulação se torna prejudicial ao ambiente (FONTES, 2008).

Um tratamento alternativo que vem sendo bastante discutido ultimamente é a biorremediação. A biorremedição é um processo que utiliza microrganismos que degradam compostos orgânicos, usando hidrocarbonetos como fonte de energia e fonte de carbono em solos, lodos, águas subterrâneas, efluentes de processo e águas superficiais contaminadas com produtos como óleo cru, hidrocarbonetos de petróleo, pesticidas e solventes industriais. A biorremediação envolve a aceleração do processo natural de biodegradação em ambientes contaminados através do aumento da disponibilidade de materiais (ex. nutrientes e oxigênio), ou da adequação de condições ambientais (ex. pH) ou da adição de microrganismos (RON e ROSENBERG, 2002).

Numerosos microrganismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras, são conhecidos pela sua capacidade de degradar hidrocarbonetos. Esses microrganismos são capazes de degradar os vários tipos de hidrocarbonetos – cadeia curta, longa e numerosos compostos aromáticos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). Todos estes compostos têm baixa solubilidade em água (RON e ROSENBERG, 2002).

Dada sua capacidade de utilizar alcanos, ácidos graxos, glicerol e óleo, cepas de *Yarrowia lipolytica* têm sido foco de estudos sendo utilizadas como agente promissor para o tratamento de contaminação com óleos mineral e vegetal (SCIOLI e VOLLARO, 1997; FELICE *et al*., 2004; KIM *et al.*, 1999).

Yarrowia lipolytica é um microrganismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos, anteriormente conhecida como *Candida lipolytica*. A levedura *Y. lipolytica* é geralmente isolada de ambientes contaminados por compostos oleosos, como a Baía de Guanabara (HAEGLER e MENDONÇA-HAEGLER, 1981), de indústrias de laticínios, participando da flora de queijos picantes (BARTH e GAILLARDIN, 1997), de produtos avícolas crus (ISMAIL *et al*., 1999), e é particularmente adaptada a substratos hidrofóbicos. Acredita-se que, evolutivamente, leveduras que vivem em meios aquosos onde a fonte de carbono é hidrofóbica e, portanto, se encontra dispersa no meio, sob a forma de gotas, tenham desenvolvido mecanismos para facilitar o acesso a este substrato devido à pequena probabilidade de contato das gotas de óleo, em constante movimento, com os microrganismos.

Certamente, as propriedades de superfície das leveduras dependem da espécie e cepa utilizada, do ambiente que a cerca e da fonte de carbono presente no meio. Muita informação nesse sentido ainda falta na literatura, principalmente em relação às interações entre o microrganismo e as gotas de compostos hidrofóbicos. O objetivo desse trabalho é empregar uma cepa de *Yarrowia lipolytica* isolada da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro – RJ (Brasil) na biodegradação de óleo cru, assim como estudar o fenômeno de hidrofobicidade celular diante de diferentes substratos (óleo cru, glicose e glicerol).

II. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo geral estudar a capacidade da levedura *Yarrowia lipolytica* em degradar óleo cru, assim como, otimizar as condições em que ocorre a biodegradação, visando a aplicação desta cepa em processos de biorremediação.

Os objetivos específicos são:

- Estudo da influência da concentração de microorganismos, concentração de óleo cru, temperatura e agitação na degradação de óleo cru;

- Avaliação dos compostos presentes no óleo cru antes e após o processo de biorremediação;

- Avaliação da hidrofocidade da cepa utilizada perante diferentes substratos.

Como forma de embasamento aos objetivos propostos neste capítulo, o Capítulo III apresenta a revisão bibliográfica, procurando fornecer base teórica bem como os resultados obtidos na literatura referentes ao tema deste trabalho. O Capítulo IV apresenta os materiais e métodos utilizados para alcançar os objetivos propostos. Em seguida, no Capítulo V são apresentados os resultados e as discussões. Para finalizar, conclusões são apresentados no Capítulo VI e sugestões para trabalhos futuros são apresentados no Capítulo VI.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1. Petróleo

Do latim *petra* (pedra) e *oleum* (óleo), o petróleo no estado líquido é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e cor variando entre o negro e o castanho-claro (THOMAS, 2001).

O petróleo é uma mistura de hidrocarbonetos parafínicos, nafênicos e aromáticos em proporções variáveis, contendo impurezas, denominadas impurezas olefínicas, como os compostos de S, N e O e metais. Estão ainda associados ao petróleo: gás natural, sedimentos (areia) e água salgada (VALLE, 2007).

O petróleo não é uma substância uniforme e suas características variam de acordo com o campo produtor, até em um mesmo campo, podendo estar dissolvidos em sua massa líquida gases, sólidos e suspensões coloidais. Em decorrência disto, as propriedades físicas do petróleo podem variar bastante, podendo-se ter óleos muito fluídos e claros, com grandes proporções de destilados leves, e óleos muito viscosos e escuros, com grandes proporções de destilados pesados.

Apesar destas diferenças em suas características físicas, sua composição elementar varia muito pouco, porque o óleo cru é composto por séries homólogas de hidrocarbonetos. As diferenças físicas são decorrentes da quantidade relativa de cada série homóloga e dos componentes individuais. A faixa de variação da composição elementar do óleo bruto é bem estreita, como mostrado na Tabela III.1 (VALLE, 2007).

Tabela III.1. Composição elementar média do óleo cru.

Elemento	% em Peso
Carbono	83 a 87
Hidrogênio	11 a 14
Enxofre	0,06 a 8
Nitrogênio básico	0,11 a 1,7
Oxigênio	0,1 a 2
Metais	até 0,3

Fonte: VALLE, 2007.

III.1.1. Constituintes do petróleo

Os principais constituintes do petróleo são os hidrocarbonetos, podendo chegar a mais de 90% de sua composição. Os outros elementos presentes aparecem sob a forma de compostos orgânicos, os quais em alguns casos formam complexos organometálicos. Os metais podem ocorrer, além disto, como sais de ácidos orgânicos. O enxofre pode ainda estar presente na forma inorgânica como H_2S.

Os constituintes do petróleo podem ser divididos em duas grandes classes:

- Hidrocarbonetos
- Não-hidrocarbonetos (compostos orgânicos sulfurados, oxigenados, nitrogenados e organometálicos).

III.1.1.1. Hidrocarbonetos

Hidrocarbonetos são compostos orgânicos formados por carbono e hidrogênio. De acordo com sua estrutura são classificados em saturados, insaturados e aromáticos. Os hidrocarbonetos saturados, também denominados de alcanos ou parafinas são aqueles cujos átomos de carbono são unidos somente por ligações simples, constituindo cadeias lineares, ramificadas ou cíclicas, interligadas ou não. Os hidrocarbonetos insaturados, também denominados de olefinas, apresentam pelo menos uma dupla ou tripla ligação carbono-carbono, enquanto os hidrocarbonetos aromáticos, também chamados de arenos, apresentam pelo menos um anel bezênico na sua estrutura.

Os hidrocarbonetos presentes no óleo cru são de diferentes tipos, ocorrendo desde compostos com 1 a 80 átomos de carbono, todos pertencentes a séries homólogas de hidrocarbonetos.

Hidrocarbonetos parafínicos normais

Os hidrocarbonetos parafínicos normais possuem fórmula geral C_nH_{2n+2} e constituem os principais hidrocarbonetos identificados nas análises de cromatografia gasosa com detector de inonização em chama (CG-DIC). A Figura III.1 ilustra os primeiros compostos dessa família.

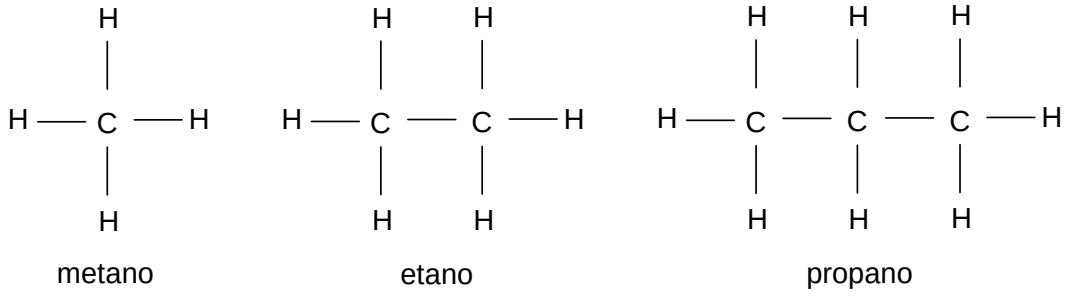

Figura III.1. Algumas estruturas de hidrocarbonetos parafínicos normais.

Hidrocarbonetos parafínicos ramificados

Os hidrocarbonetos parafínicos ramificados podem apresentar ramificações em um ou mais átomos de carbono e são também denominados de isoparafinas, ou isoalcanos. Apresentam a mesma fórmula geral dos alcanos normais. Entre os alcanos ramificados, são usualmente encontrados em petróleos os isoalcanos (2-metil alcanos) e os anteisoalcanos (3-metil alcanos) (KILLOPS e KILLOPS, 2005). A maior concentração individual de alcanos ramificados no petróleo é encontrada na forma de 2-metil ou 3-metil hexanos e/ou heptanos, os quais podem chegar a 1% no óleo cru (TISSOT e WELTE, 1984; HUNT, 1995).

Dentre os alcanos ramificados são encontrados ainda os isoprenóides ou terpenóides, substâncias compostas de subunidades do isopreno (ou metil butadieno). Os isoprenóides são divididos em famílias com base no número aproximado de subunidades do isopreno que eles contêm, conforme disposto pela regra do isopreno. Com base no fato de que todos os organismos vivos, desde bactérias até o ser humano requerem isoprenóides, estabelece-se a regra de que a biossíntese de diversos compostos ramificados constituintes da matéria orgânica ocorre por polimerização de subunidades funcionalizadas do C_5 isopreno. Assim, monoterpanos possuem duas unidades de isopreno, diterpanos possuem quatro e triterpanos possuem seis unidades de isopreno, por exemplo, geralmente ligados pela junção cabeça-cauda (PETERS *et. al*., 2005). Os isoprenóides não se apresentam, contudo, necessariamente na forma exata estabelecida pela regra do isopreno, podendo-se encontrar inúmeros exemplos de isoprenóides derivados de uma determinada família com diferentes quantidades de átomos de carbono, em função do ambiente de deposição da matéria orgânica e do grau de maturação térmica do óleo gerado. Assim, estruturas degradadas, alteradas ou homólogas podem ainda ser enquadradas em suas respectivas famílias dos isoprenóides.

Os isoprenóides mais abundantes no petróleo são o Pristano (2,6,10,14 tetrametil pentadecano – C_{19}) e o Fitano (2,6,10,14 tetrametil hexadecano – C_{20}), pois juntos somam mais de 55% de todos os isoprenóides acíclicos (TISSOT e WELTE, 1984; HUNT, 1995). O Pristano, apesar de constituído de um grupo metileno a menos que o Fitano, é ainda classificado como diterpano (família dos isoprenóides acíclicos constituídos de quatro unidades de isopreno). Tanto o Pristano quanto o Fitano fazem parte de uma classe especial de compostos, chamada de biomarcadores de petróleo, porque são originados a partir da decomposição das clorofilas. Durante a diagênese e catagênese, processos de maturação da matéria orgânica sedimentar que irão originar o petróleo, as clorofilas são convertidas em vários produtos, aí incluídos o Pristano, Fitano e as porfirinas (PETERS *et. al.*, 2005).

Os hidrocarbonetos parafínicos normais e ramificados encontrados no petróleo vão desde metano até parafinas com 42 átomos de carbono. A Figura III.2 apresenta a estrutura de alguns hidrocarbonetos parafínicos ramificados.

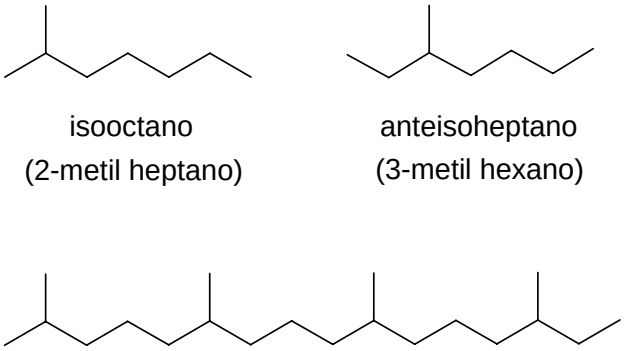

Figura III. 2. Algumas estruturas de hidrocarbonetos parafínicos ramificados.

Hidrocarbonetos parafínicos cíclicos

Os cicloalcanos, de fórmula geral C_nH_{2n}, contendo um ou mais anéis saturados, são conhecidos na indústria do petróleo como naftênicos. Compostos como ciclopentano, ciclohexano e seus derivados metilados de baixo peso molecular, que contém menos de 10 átomos de carbono, são importantes constituintes do petróleo,

sendo o metilciclohexano o mais abundante, podendo atingir até 2,4% do teor de alguns óleos (TISSOT e WELTE, 1984).

Podem ainda ocorrer no petróleo compostos naftênicos formados por 2 ou mais anéis, tais com anéis isolados por uma cadeia parafínica, anéis conjugados (dicicloexilalcano) e anéis condensados (decalina e colestano, dentre outros) (VALLE, 2007). A Figura III.3 apresenta alguns compostos parafínicos cíclicos encontrados no petróleo.

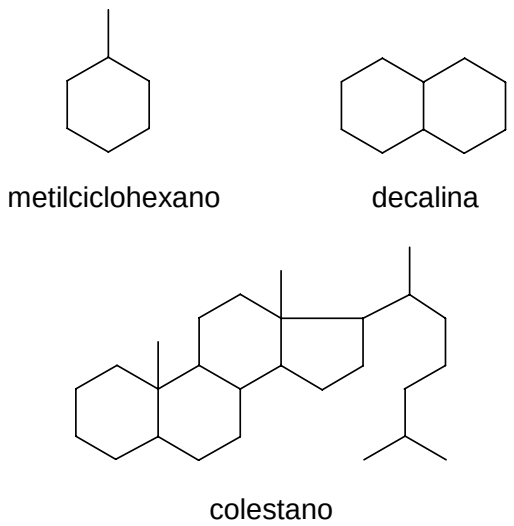

Figura III.3. Algumas estruturas de hidrocarbonetos parafínicos cíclicos.

Hidrocarbonetos insaturados

Os hidrocarbonetos insaturados, dos quais os mais comuns são os alcenos, apesentam a fórmula geral C_nH_{2n}. Dependendo do número de duplas ligações, são conhecidos como diolefinas, triolefinas, etc. A Figura III.4 apresenta alguns compostos desse grupo.

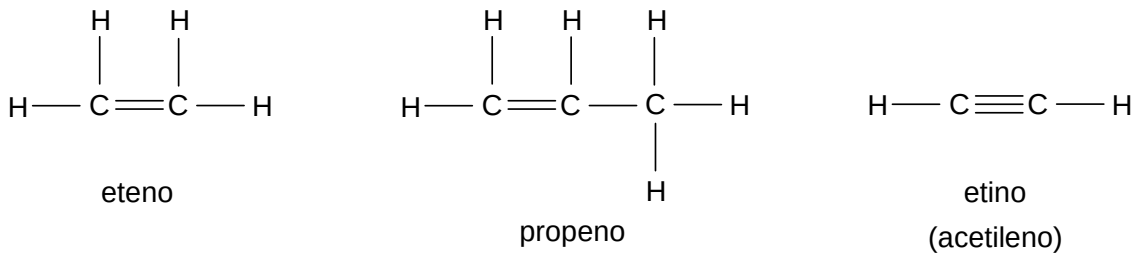

Figura III.4. Algumas estruturas de hidrocarbonetos insaturados.

Hidrocarbonetos aromáticos

São constituídos por ligações duplas e simples que se alternam em anéis com seis átomos de carbono. O composto mais simples é o benzeno. Ao contrário dos compostos insaturados, o benzeno tem considerável estabilidade e todos os compostos que contêm o anel benzênico são conhecidos como hidrocarbonetos aromáticos. Tal como nos naftênicos, pode ocorrer a presença de aromáticos formados por mais de uma anel benzênico, que podem estar isolados, conjugados ou condensados (Figura III.5).

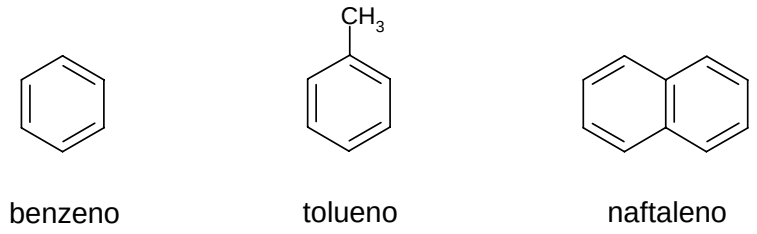

Figura III.5. Algumas estruturas de hidrocarbonetos aromáticos.

No petróleo, existem, ainda, compostos mistos, isto é, que apresentam o núcleo aromático e o naftênico, os quais são os maiores constituintes das frações pesadas, podendo chegar a mais de 10% em peso destas frações. Estes compostos possuem um ou vários anéis aromáticos, condensados entre si e com outros anéis naftênicos, sendo o mais comum a estrutura que apresenta cinco anéis (VALLE, 2007).

III.1.1.2. Não-hidrocarbonetos

O petróleo contém apreciável quantidade de constituintes que possuem elementos como S, N, O e metais. Estes constituintes considerados como impurezas, tendem a se concentrar nas frações mais pesadas e podem causar corrosão, redução da eficiência dos catalisadores na refinaria e poluição ambiental.

Compostos sulfurados

Compostos de enxofre estão presentes em todos os tipos de petróleo cru na forma inorgânica ou orgânica e, em geral, quanto maior a densidade do petróleo maior será seu teor de enxofre.

O enxofre é o terceiro elemento mais abundante encontrado no petróleo e a sua concentração varia muito de um petróleo para outro. Além disso, o seu conteúdo está relacionado à densidade do óleo e, assim, à sua qualidade (leve ou pesado).

O enxofre ocorre no petróleo nas seguintes formas: mercaptans, sulfetos, polissulfetos, benzotiofenos e derivados, moléculas policíclicas contendo ainda N e O, ácido sulfídrico, enxofre elementar (muito raro) (VALLE, 2007).

Os compostos sulfurados, além de indesejavéis, pois concorrem para aumentar a polaridade dos óleos (aumentando a estabilidade das emulsões), são responsáveis pela corrosividade dos produtos do petróleo, contaminam os catalisadores utilizados nos processos de transformação e determinam a cor e o cheiro dos produtos finais. São tóxicos e produzem SO_2 e SO_3 por combustão, gases altamente poluentes da atmosfera, os quais formam H_2SO_3 e H_2SO_4 em meio aquoso, causadores da chuva ácida (THOMAS, 2001).

Compostos nitrogenados

Os compostos nitrogenados apresentam-se quase que em sua totalidade na forma orgânica e são termicamente estáveis. Aparecem nas formas de piridinas, quinolinas, pirróis, indóis, porfirinas, e compostos policíclicos com enxofre, oxigênio e metais.

Os compostos nitrogenados aumentam a capacidade do óleo de reter água em emulsão. Durante o refino tornam instáveis os produtos finais, propiciando a formação de gomas e alterando a coloração, além de serem também responsáveis pela contaminação dos catalisadores (THOMAS, 2001).

Compostos oxigenados

Praticamente todos os grupos funcionais envolvendo oxigênio estão presente no petróleo, tais como ácidos carboxílicos, fenóis, cresóis, ésteres, amidas, cetonas e benzofuranos (VALLE, 2007).

De um modo geral, eles tendem a se concentrar nas frações mais pesadas e são responsáveis pela acidez e coloração, odor, formação de gomas e corrosividade das frações do petróleo (THOMAS).

Resinas e Asfaltenos

Ocorrem no petróleo compostos de estrutura complexa policíclica aromática ou naftênico-aromática contendo átomos de S, N, O e metais.

Estes compostos são chamados de resinas (peso molecular de 500 a 1000) e de asfaltenos (peso molecular > 1000) e apresentam alta relação atômica carbono/hidrogênio e alta porcentagem em peso de S, N e O.

A estrutura básica das resinas e asfaltenos são semelhantes, mas existem diferenças importantes. As resinas apresentam núcleo aromático de menor tamanho e número, o que reduz a possibilidade de ligações intermoleculares. Como consequência, eles possuem menor peso e tamanho molecular e menor relação carbono/hidrogênio do que os asfaltenos já que apresentam menor agregação dos anéis aromáticos. As resinas não são instavéis, se decompõem sob a ação do ar e da luz solar, evoluindo, provavelmente, para a formação dos asfaltenos (VALLE, 2007).

Compostos metálicos

Os organometálicos tendem a se concentrar nas frações mais pesadas e ocorrem, em geral, de uma forma bem complexa, ou seja, quelados, tendo como base a porfirina, onde o metal é complexado.

Os metais que podem ocorrer no petróleo são: ferro, zinco, cobre, chumbo, molibdênio, cobalto, arsênio, manganês, cromo, sódio, níquel e vanádio, sendo os dois últimos de maior incidência (THOMAS, 2001).

III.1.2. Classificação do Petróleo

Na Tabela III.2 podemos ver a classificação do petróleo proposta por Tissot (THOMAS, 2001) baseada no conteúdo químico primário do petróleo: parafinas, naftênicos, aromáticos mais compostos sulfurados, nitrogenados (asfaltenos e resinas).

Tabela III. 2. Classificação dos Diferentes Tipos de Petróleo.

TIPO DE ÓLEO	CONCENTRAÇÃO		S%
Parafínico	S > 50%	P > N e P > 40%	< 1
Parafínico naftênico	A < 50%	P e N < 40%	
Naftênico		N > P e N > 40%	
Aromático intermediário	S > 50%	P > 10%	> 1
Aromático asfáltico	A > 50%	P < 10% N < 25%	
Aromático naftênico		P < 10% N > 25%	

S = saturados, A = aromáticos + resinas + asfaltenos, P = parafinas, N = naftênicos.
S% = porcentagem de enxofre.
Fonte: adapatado de VALLE, 2007.

Os petróleos parafínicos são mais leves, densidade específica inferior a 0,85, possuem viscosidade baixa e alto ponto de fluidez. Os petróleos naftênicos são mais pesados e viscosos do que os parafínicos e mais leves e menos viscosos do que os aromáticos. A densidade específica dos petróleos aromáticos é superior a 0,85. Estes últimos são os que possuem maior teor de enxofre, devido ao alto percentual de resinas e asfaltenos.

O US Bureau of Mines (GARY) classifica os diferentes petróleos em função das densidades de duas frações do petróleo como mostrado na Tabela III.3, baseando-se no fato de que a densidade de um hidrocarboneto puro está relacionada com a relação H/C e a densidade decresce com o aumento da relação H/C.

Tabela III. 3. Estimativa da Natureza do Óleo Cru Baseada na Medida de Duas Densidades Específicas.

ÓLEO CRU	DENSIDADE ESPECÍFICA DO CORTE GASOLINA PESADA	DENSIDADE ESPECÍFICA DO RESÍDUO (PE > 350°C)
Parafínico	Abaixo de 0,760	Menor que 0,930
Intermediário Parafínico	Menor que 0,760	Entre 0,930 e 0,975
Asfáltico Parafínico	Menor que 0,760	Maior que 0,975
Parafínico Intermediário	Entre 0,760 e 0,780	Menor que 0,930
Intermediário	Entre 0,760 e 0,780	Entre 0,930 e 0,975
Asfáltico Intermediário	Entre 0,760 e 0,780	Maior que 0,975
Parafínico Naftênico	Entre 0,780 e 0,800	Menor que 0,930
Intermediário Naftênico	Entre 0,780 e 0,800	Entre 0,930 e 0,975
Parafínico Aromático	Maior que 0,800	Menor que 0,930
Aromático	Maior que 0,800	Entre 0,930 e 0,975
Asfáltico	Maior que 0,780	Maior que 0,975

PE = ponto de ebulição
Fonte: VALLE, 2007

Os petróleos podem ainda ser classificados pelo seu °API, escala idealizada pelo American Petroleum Institute (API), conforme mostra a Tabela III.4. O °API é uma medida de densidade baseada na densidade específica calculada pela Eq. 3.1.

$$^{\circ}API = \left(141{,}5 \Big/ d_{15{,}6/15{,}6} \right) - 131{,}5 \qquad (3.1)$$

onde: $d_{15,6/15,6}$ é a densidade relativa do produto a 15,6°C em relação a densidade da água também a 15,6°C.

Tabela III.4. Classificação do Petróleo em Função do °API.

DENSIDADE °API	CLASSIFICAÇÃO
API > 40	Extraleve
40 > API > 33	Leve
33 > API > 27	Médio
27 > API > 19	Pesado
19 > API > 15	Extrapesado
API < 15	Asfáltico

Fonte: VALLE, 2007

III.1.3. Petróleo e o Meio Ambiente

O comércio internacional de petróleo baseia-se essencialmente no transporte marítimo, que vem se expandindo bastante pelo aumento tanto da frota de petroleiros como do tamanho destes. Isto significa que tanto a probabilidade como as conseqüências de um acidente também aumentaram enormemente. A experiência dos grandes acidentes de derramamento de óleo mostrou a importância dos danos causados ao meio ambiente, prejudicando a vida marinha, a pesca e o turismo. (CARDOSO, 2007).

Os mares e os oceanos são uma fonte abundante de recursos biológicos e naturais, comparáveis ou até mesmo superiores às florestas tropicais, essenciais para determinar o clima da Terra. São responsáveis pela constante reciclagem de produtos químicos, nutrientes e água. São ainda uma fonte importantíssima de alimentos e emprego, além de constituírem vias naturais de comunicação, transporte e comércio (CARDOSO, 2007).

A maior parte do óleo que chega aos oceanos é proveniente de eventos menos agudos, como descargas rotineiras de navios, poluição atmosférica e óleo lubrificante descartado em águas pluviais, entretanto são os derramamentos provenientes de dutos e navios que recebem maior apelo para seu combate, dado a grande visibilidade e pelas consequências trágicas que a poluição aguda pode provocar sobre os ecossistemas atingidos (SOUZA FILHO, 2006), como foi o caso do derramamento ocorrido a Espanha em 2002 (Figura III.6).

O dano causado por um incidente de derramamento de óleo no mar depende de diversos fatores, como o clima, o tipo e quantidade do produto derramado, se o produto atinge a costa e áreas ambientalmente sensíveis, se a região impactada já havia sofrido com episódios anteriores e, até mesmo se a fonte de poluição permanece em condições de prover nova liberação de poluentes, como é o caso de navios-tanque que após o seu naufrágio ainda permanecem com parte da carga de óleo armazenada em seus tanques (LOBÃO, 2007) (Figura III.7).

Figura III.6. Ave coberta de óleo numa praia da Espanha após o naufrágio, e o consequente derramamento de óleo, do navio petroleiro Prestige, ocorrido em 2002 (FERRÃO, 2005).

Figura III.7. Vazamento de óleo através de rachadura no casco soçobrado do navio tanque da marinha norte-americana USS Mississinewa, observado em setembro de 2001 (MICHEL *et al.*, 2005).

No Brasil, acontecimentos recentes incluem a liberação de petróleo bruto e óleo combustível em terra e ecossistemas costeiros, relacionados aos incidentes ocorridos na Baía da Guanabara (Rio de Janeiro), nos rios Barigui e Iguassú (Paraná) e no canal de São Sebastião (São Paulo), que resultaram em danos aos ecossistemas atingidos. Na Baía da Guanabara foram liberados cerca de 1300 m^3 de óleo MF-380 como conseqüência do rompimento de um oleoduto em refinaria da Petrobrás. O episódio ocorrido no Paraná consistiu da liberação de 4.000 m^3 de petróleo bruto (41º API), também pelo rompimento de um oleoduto da Petrobrás. O derrame ocorrido no canal de São Sebastião consistiu da liberação de cerca de 86 m^3 de petróleo bruto devido à colisão de um navio petroleiro com o cais do terminal da Petrobrás. Além desses três episódios citados, o naufrágio da plataforma de petróleo P-36, da Petrobrás – ocorrido em março de 2001 – também ocasionou derramamento de óleo, só que diferentemente dos outros episódios relatados, como a plataforma encontrava-se em alto-mar e também pela ação de resposta da empresa, não foram observados danos aparentes a áreas ambientalmente sensíveis ou de intensa utilização humana (FERRÃO, 2007).

A maior parte do petróleo brasileiro é extraída de plataformas de produção instaladas no mar, em sua maioria, na Bacia de Campos. Além disso, parte do petróleo utilizado no país é transportada por via marítima, principalmente para o abastecimento de refinarias localizadas em áreas distantes das zonas produtoras de petróleo, as quais recebem óleos nacionais e/ou importados, para comporem "blends" (misturas de óleos brutos) adequados aos seus processos de refino. Conclui-se que as rotas de navegação e os terminais de carga e descarga de óleo são os ambientes de maior risco para a introdução aguda de poluentes advindos da indústria do petróleo, decorrentes do transporte de óleo bruto, combustíveis e lubrificantes. Outras vias de introdução não tão aparentes, mas também danosas, consistem de operações de lavagem de tanques de embarcações e da descarga de água de lastro contaminada por óleo, dentre outras operações irregulares, já que se tratam de episódios bastante freqüentes em que quantidades relativamente pequenas de óleo são descartadas de forma inadequada e acabam por poluir o meio ambiente de forma crônica.

Quando derramado no mar, o petróleo sofre alterações na sua composição original devido ao processo de intemperismo do óleo, conforme será explicado a seguir.

III.1.3.1. Comportamento do Óleo no Mar

O comportamento de óleos derramados nos mais diversos ecossistemas, e principalmente no mar, depende da composição química do petróleo, e também, da atuação de processos como evaporação, dispersão, emulsificação, dissolução, biodegradação, oxidação e das interações entre óleo, sedimentos e água. A combinação destes processos é conhecida como intemperismo, o qual reduz a concentração de diferentes grupos de compostos, modificando as características químicas e físicas do petróleo (SOUZA e TRIGÜIS, 2005).

Os processos intempéricos, que atuam sobre um óleo derramado no mar, podem ocorrer simultaneamente, mas a diferentes velocidades. A velocidade e a extensão desses processos dependem das propriedades físicas e químicas do óleo original e de condições ambientais, como: temperatura, velocidade e direção dos ventos e das correntes marinhas. A evaporação é a responsável pelas mudanças mais importantes ocorridas no óleo durante um derrame. Nos ambientes tropicais, as temperaturas elevadas fazem com que a perda por evaporação dos componentes voláteis do petróleo seja mais rápida, diminuindo seus efeitos tóxicos sobre a microflora local (SOUZA e TRIGÜIS, 2005).

Os compostos saturados, predominantes na maioria dos óleos, são os mais suscetíveis à evaporação, biodegradação e à dispersão. Os compostos aromáticos de baixo peso molecular são parcialmente solúveis em água, mas evaporam rapidamente após um derrame. Os hidrocarbonetos aromáticos de elevado peso molecular (PAH) não apresentam o mesmo comportamento, sendo considerados tóxicos aos organismos aquáticos, em função do seu potencial carcinogênico e neurotóxico (SOUZA e TRIGÜIS, 2005).

Sendo assim, logo após o derramamento de petróleo no mar já se inicia o processo de intemperismo, que consiste, portanto, da ação combinada de processos como espalhamento, evaporação, dispersão, emulsificação, dissolução, oxidação, agregação, sedimentação e biodegradação do óleo derramado no ambiente marinho (FERRÃO, 2005). A Figura III.8 apresenta um esquema mostrando o destino do óleo após o derramamento.

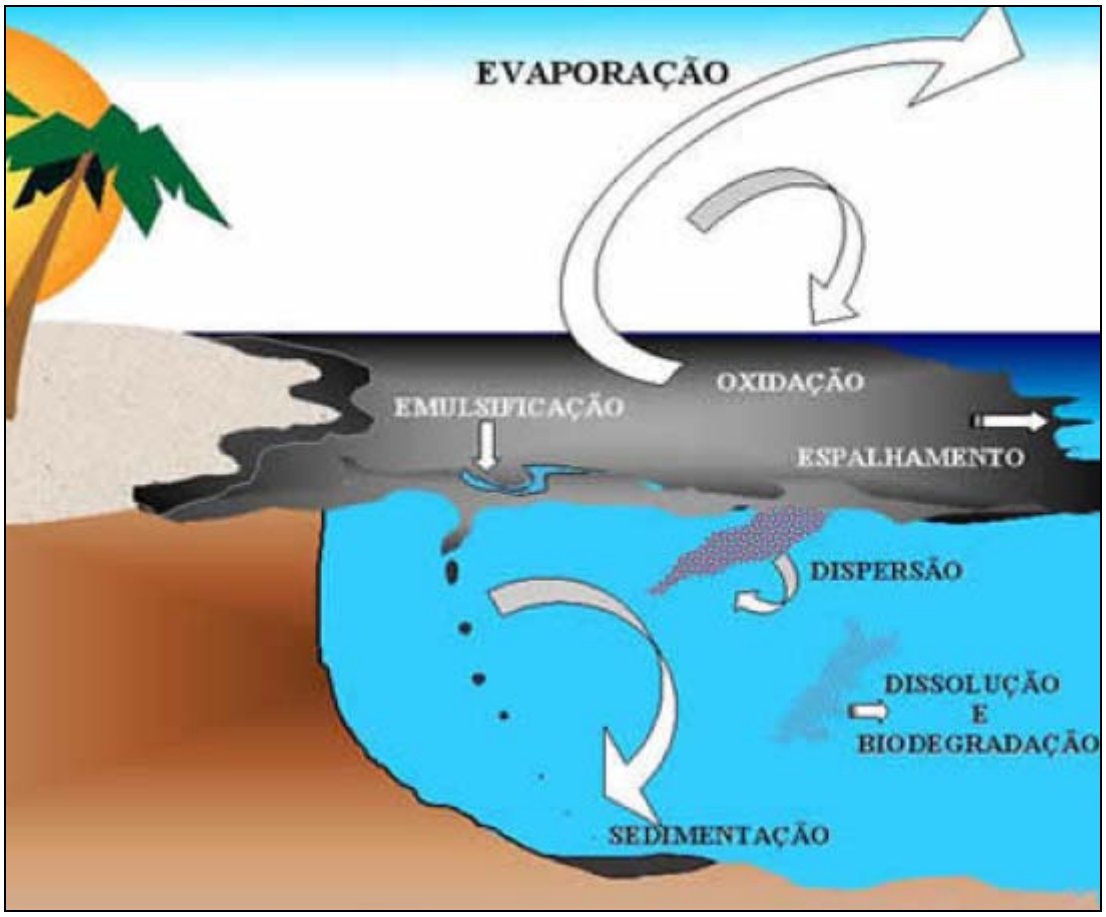

Figura III.8. Destino do óleo derramado (FERRÃO, 2005).

Espalhamento

O espalhamento é um dos processos mais importantes nas primeiras horas após o derrame. Esse processo consiste no movimento horizontal do óleo na superfície da água devido aos efeitos da volatilidade, força gravitacional, viscosidade e tensão superficial do óleo, originando a mancha de óleo. Outros fatores ambientais como correntes marinhas, velocidade do vento, temperatura e condições de mar contribuem para o espalhamento do óleo. Quando comparados aos óleos leves, os óleos pesados não se espalham prontamente, devido à sua elevada densidade específica. Da mesma forma, a viscosidade influencia no espalhamento do óleo no mar, ou seja, óleos mais viscosos tendem a se espalhar mais lentamente do que óleos menos viscosos. O espalhamento envolve o óleo derramado como um todo, isto é, não altera a composição química do óleo derramado nem separa os seus diversos constituintes.

Evaporação

A evaporação consiste na transferência de compostos leves e médios do óleo da fase líquida para a atmosfera, sendo influenciada também pela taxa de espalhamento

(quanto maior a superfície de contato com o ar, maior será a evaporação) e por condições climáticas e de mar (fatores como agitação dos mares, grandes velocidades de vento e climas quentes também funcionam como aceleradores do processo de evaporação). Esse processo depende principalmente da volatilidade do óleo, função da sua composição. É responsável pelas mudanças mais importantes ocorridas na composição do óleo, com ação marcante nos primeiros dias após um derrame. Em poucos dias, dependendo da sua composição, petróleos leves podem perder até 75% de seu volume e petróleos médios, até 40%. Em contraste, óleos pesados perdem não mais do que 10% de seu volume nos primeiros dias após um derrame (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003). Compostos de elevada volatilidade evaporam rapidamente após um derrame, alterando a composição química da mancha à medida que estes compostos vão sendo retirados do óleo, o que causa um aumento na viscosidade e na densidade do óleo derramado.

Dispersão

Ocorre através da quebra da mancha de óleo em pequenas gotículas suspensas na coluna d'água facilitando o processo de biodegradação e sedimentação. As gotículas pequenas permanecem em suspensão, enquanto que as maiores tendem a subir para a superfície, formando uma finíssima camada de óleo.

As ondas e a turbulência marinha ajudam neste processo de dispersão do óleo. A viscosidade e a tensão superficial também influenciam este processo, pois quanto mais viscoso e maior a tensão superficial do produto, menor a dispersão.

Dissolução

A dissolução consiste na partição de substâncias presentes no óleo entre a fase oleosa e fase aquosa. O grau de dissolução depende da composição do óleo, da temperatura, composição química da água e de processos físicos como o grau de espalhamento da mancha e da taxa de dispersão. Como a maior parte dos componentes de uma mancha são solúveis na fase oleosa, somente traços de óleo se dissolvem em água, exceto hidrocarbonetos aromáticos leves, como o benzeno, tolueno e xilenos. Entretanto, a maioria destes compostos leves evaporam antes da dissolução, sendo sua contribuição pouco significativa. A dissolução é um processo que se inicia logo após o derrame e se perpetua ao longo do tempo, uma vez que oxidação e biodegradação podem formar subprodutos solúveis em água.

Emulsificação

Consiste na incorporação de água ao óleo formando uma emulsão água-óleo, favorecido pelas condições de mar moderadas a encrespadas. Porém, emulsões podem se separar em água e óleo novamente quando as condições de mar forem calmas ou quando estiverem encalhados na costa, e se forem aquecidos pela luz solar. Alguns tipos de óleo formam emulsões estáveis que são chamadas de *mousse*, que é relativamente resistente a outros processos de intemperização, aumentando de duas a três vezes o volume total de óleo remanescente no ambiente.

As emulsões de água em óleo, costumam persistir por meses ou até mesmo anos após o derramamento. Grande parte da emulsão é formada ainda durante a primeira semana após a perda dos componentes leves, devido principalmente aos processos de evaporação e dissolução (FERRÃO, 2005).

O processo depende diretamente da viscosidade, da composição do óleo, e do hidrodinamismo do mar. Óleos mais viscosos, com componentes pesados, tendem a formar emulsões água-óleo estáveis, resistentes às alterações físico-químicas.

Oxidação

Neste processo as moléculas de hidrocarbonetos reagem com o oxigênio do ambiente formando compostos que tendem a ser mais solúveis e tóxicos. Como estas reações ocorrem preferencialmente na superfície, são aceleradas pelo grau de espalhamento da película de óleo. É relativamente lenta em comparação aos demais processos de alteração físico-química, por estar condicionada à quantidade de oxigênio que pode penetrar na película e pela incidência de radiação solar (LOBÃO, 2007).

Contribui para o intemperismo do óleo, uma vez que forma compostos solúveis. Sais minerais dissolvidos em água aceleram a taxa de oxidação. Traços de metais presentes no óleo funcionam como catalisadores das reações de oxidação. Os raios ultravioleta funcionam igualmente como catalisadores, constituindo o que chamamos de fotoxidação. A razão de degradação é, em grande parte, influenciada pelo comprimento de onda incidente, pela concentração de materiais particulados suspensos, pela concentração de aromáticos de alto peso molecular e pela espessura da mancha.

Sedimentação

Ocorre principalmente devido à adesão de partículas de sedimento ou matéria orgânica ao óleo. Poucos óleos crus são suficientemente densos para afundar, por isso é

necessária a união com outras partículas. Normalmente ocorre com os componentes pesados que não se dissolvem na água.

Depende da densidade específica, do grau de dispersão e dos sólidos suspensos na água. Quanto maior a densidade específica, menos partículas em suspensão são necessárias para que o óleo se sedimente.

Inicia-se logo após o derrame, atingindo seu pico algumas semanas depois. Uma vez sedimentado, os processos de degradação do óleo são drasticamente reduzidos.

Biodegradação

Consiste na degradação do óleo por microorganismos naturalmente presentes no mar. Apesar de significativo, é um processo lento, influenciado pela temperatura e pela disponibilidade de oxigênio e nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, no ambiente. A biodegradação consiste em um perfeito processo de autodepuração, já que, mesmo quando os microorganismos não estão presentes em número suficiente, proliferam-se muito rapidamente em condições apropriadas. Quando o óleo se transforma em gotículas suspensas no meio aquático, a área interfacial aumenta, facilitando a biodegradação. Ocorre na superfície e na coluna d'água, no sedimento e na costa, podendo persistir por muitos anos.

A taxa de biodegradação também depende do tipo de produto derramado e de sua solubilidade em água. Hidrocarbonetos alifáticos são os mais facilmente degradados, enquanto compostos polares e de maior peso molecular são os menos susceptíveis (PETERS *et al.*, 2005).

A biodegradação é um processo aproximadamente sequencial. Conforme a escala de biodegradação proposta por WENGER e ISAKSEN (2002) para descrever as alterações de hidrocarbonetos em reservatórios, apresentada na Figura III.9, níveis leves de biodegradação são suficientes para promover a remoção de *n*-alcanos e isoalcanos de médio e alto peso molecular.

Biomarcadores saturados e aromáticos são biodegradados somente após o consumo dos *n*-alcanos, da maioria dos alcanos ramificados e alquil benzenos. Biomarcadores na faixa de C_{15}-C_{35} só são alterados na ocorrência de biodegradação pesada ou severa. Na escala de biodegradação apresentada na Figura III.9, linhas tracejadas indicam a fase em que as primeiras alterações são observadas; as linhas cinzas sólidas indicam significativa remoção e as linhas pretas sólidas indicam a fase em que ocorre a completa remoção de uma determinada classe de hidrocarbonetos. Extrapolando a escala de biodegradação para amostras ambientais, observa-se que tais biomarcadores, na mesma medida em que são recalcitrantes no meio ambiente, são

bastante adequados para esclarecer a autoria de episódios de derramamentos de óleos, por meio de técnicas de determinação da "impressão digital" de óleos.

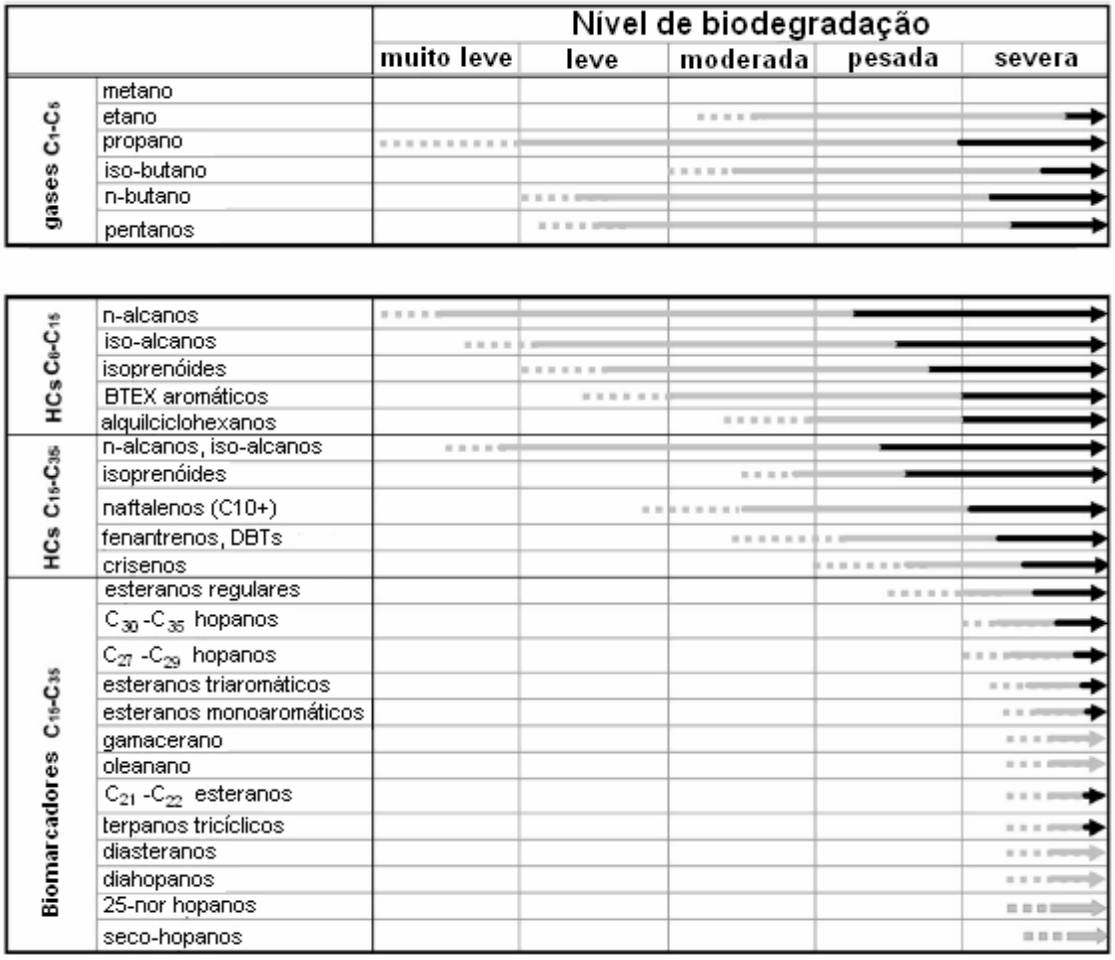

Figura III.9. Sequência de remoção de grupos moleculares em níveis crescentes de biodegradação (WENGER e ISAKSEN, 2002).

III.1.3.2. Efeitos de um Derramamento de Óleo no Mar

A utilização do petróleo pode causar diversos tipos de impactos ao meio ambiente, e mais especificamente ao ambiente marinho, destruindo habitats de espécies causando declínio de suas populações. O perigo é proveniente desde o processo de extração até o consumo, passando pelo transporte que é o principal poluidor por vazamentos em grande escala de navios petroleiros.

Os efeitos de um derramamento de óleo dependerão de muitos fatores, além das propriedades do óleo. Deve-se considerar também a sensibilidade ambiental da área. Em áreas mais costeiras, onde a profundidade e distância da costa são menores, os impactos

relativos ao derramamento de óleo são extremamente relevantes, pois tendem a se manifestar com mais força do que em áreas mais profundas.

Não se pode esquecer das atividades *offshore*, que também representam grandes riscos de poluição por derramamento nas fases de perfuração e produção. Essas atividades implicam em impactos adicionais a da atividade de transporte, como por exemplo, os resultantes do descarte de fluidos e cascalhos na fase de perfuração. Na fase de produção podemos citar o descarte de "água inibida", revolvimento do assoalho oceânico, emissões atmosféricas, entre outros (FERRÃO, 2005).

Os critérios para avaliação dos impactos decorrentes de um derramamento das atividades *offshore* são os mesmos para as de transporte, devendo ser considerado tipo de óleo, condições climáticas e as áreas afetadas, abrangendo também os impactos sócio-econômicos.

Os efeitos do óleo na vida marinha, simplificadamente, são o abafamento, e a contaminação física ou química das espécies. Porém, os efeitos negativos se estendem às operações incorretas de limpeza, danificando a flora e a fauna (FERRÃO, 2005).

Aves Marinhas

As aves são uma das espécies mais vulneráveis quando o derrame se dá em ambientes costeiros, sendo estas totalmente recobertas pelo óleo, o que pode resultar em perda de temperatura do corpo, perturbações na locomoção, ou em morte por asfixia. O contato físico é a principal causa de morte das aves, porém a inalação de compostos voláteis também as prejudica. As aves que mergulham para se alimentar ou que passam grande parte do tempo sobrevoando o mar são as mais afetadas.

O combate aos efeitos do óleo nas aves é bastante difícil e requer grande infraestrutura e o envolvimento de várias pessoas, como biólogos e veterinários, que devem tentar combater vários itens como: stress, hipotermia, desidratação, anemia conseqüente de hemorragias, entre outros. Para isso, serão necessárias áreas para lavar, abrigar, examinar e acomodar os animais, além de equipamentos como aquecedores de água, bacias, detergentes e freezers. Uma equipe de apoio também deve estar disponível com medicamentos e alimentação (FERRÃO, 2005).

Peixes / Atividades Pesqueiras

Em espécies comestíveis, a contaminação por óleo torna os peixes impróprios para o consumo e passam a não ser mais negociados, trazendo grandes prejuízos à comunidade pesqueira tanto da modalidade oceânica como da litorânea. Com isso, famílias de pescadores perdem sua fonte de sustento.

A mortandade dos peixes se dá por intoxicação e falta de oxigênio na superfície, e no fundo, os peixes morrem por se alimentarem dos resíduos que afundam. Também ocorre a obstrução ou injúria das brânquias, resultando na necrose dos tecidos (FERRÃO, 2005).

Manguezal

Sistemas como os manguezais são mais complexos e tendem a resistir mais eficientemente às perturbações ambientais. No entanto, um acidente de grandes proporções ocasionaria altas taxas de mortalidade das espécies dos manguezais, as quais se recuperariam, naturalmente, somente após um longo período de tempo. Sendo assim, caso a mancha de óleo chegue aos manguezais e estuários, ela provavelmente causará alterações.

Quando um derramamento de óleo chega a um manguezal, o sistema de raízes fica completamente impermeabilizado, tornando as árvores incapazes de absorver oxigênio e nutrientes. Os vegetais perdem as folhas e ficam incapacitados de realizar a fotossíntese. Alguns animais que habitam esses ecossistemas morrem em poucos dias por não poder respirar, enquanto outros se intoxicam aos poucos ao comerem folhas e outros seres contaminados.

A resposta do manguezal a um acidente dependerá do tipo de óleo e da espessura da camada de óleo, entre outros fatores. Apesar de serem considerados capazes de recuperar o solo e a água de regiões afetadas por acidentes envolvendo derramamento de petróleo, a perda acentuada de folhas e brotos pode não conseguir ser compensada pela produção de novas folhas, impedindo a recuperação do vegetal (FERRÃO, 2005).

Conseqüências econômicas

Como já dito anteriormente, a atividade pesqueira é considerada uma das mais afetadas após um derrame de óleo devido a grande mortandade dos peixes que seriam sua única fonte de sustento.

A contaminação de uma área afeta muitas atividades além da pesca como, por exemplo, o turismo, as indústrias que são supridas pela água do mar, as estações de energia situadas próximo da costa e as atividades recreacionais, tais como natação, pesca, mergulho e navegação.

A limpeza de áreas atingidas pela "maré negra" é de elevado custo, dando prejuízo às empresas envolvidas e ainda oferece grande risco à saúde pública, uma vez que pode ocorrer explosões, incêndios ou intoxicação.

Existem muitos outros fatores associados aos efeitos de um derramamento de petróleo, e muitas outras espécies que são bastante vulneráveis, como pingüins e golfinhos, que acabam morrendo de inanição ou por problemas respiratórios por não receberem o tratamento adequado. Há também muitas outras formações que podem ser atingidas por um desastre, como os costões rochosos, lagoas costeiras e praias arenosas, cujos impactos são de extrema relevância, tendo em vista as perdas, que podem ser irreparáveis se as técnicas de limpeza não forem utilizadas corretamente (FERRÃO, 2005).

De um modo geral, os ecossistemas são sempre afetados, em maior ou menor grau, conforme a gravidade e as conseqüências, como alteração de pH, diminuição de oxigênio dissolvido e diminuição do alimento disponível e, estas atingem sempre maior relevância em ecossistemas fragilizados, ou quando as medidas de combate do derrame se revelam insuficientes. (FERRÃO, 2005)

Atualmente, várias técnicas e equipamentos têm sido utilizados para combater, conter e recuperar um derramamento de óleo, incluindo em geral métodos físicos e químicos. Esses métodos serão descritos a seguir.

III.1.3.3. Técnicas de Combate a Incidentes de Derramamento de Óleo

As principais técnicas de limpeza utilizadas em caso de derramamento de óleo são:

Barreiras de Contenção e Skimmers

As barreiras de contenção possuem a finalidade de conter derramamentos de petróleo e derivados, concentrando, bloqueando ou direcionando a mancha de óleo para locais menos vulneráveis ou mais favoráveis ao seu recolhimento. Elas também podem ser utilizadas para proteger locais estratégicos, evitando que as manchas atinjam áreas de interesse ecológico ou sócio-econômico.

Na maioria das vezes a contenção do óleo é realizada conjuntamente com ações de remoção do produto. Para tanto uma série de equipamentos ou materiais podem ser utilizados como "skimmers", barcaças recolhedoras, cordas oleofílicas, caminhões vácuo, absorventes granulados, entre muitos outros. A aplicabilidade de cada um deles está associada a fatores como tipo de óleo, extensão do derrame, locais atingidos, acessos e condições meteorológicas e oceanográficas.

O uso de barreiras para conter e concentrar o óleo flutuante e sua recuperação através de “skimmers”, normalmente é visto como a solução ideal para remover o óleo derramado no ambiente marinho. Mas, infelizmente, o método vai de encontro à tendência natural do óleo que é de se espalhar conforme a influência de ventos, ondas e correntes. Em águas agitadas um grande derramamento de um óleo de baixa viscosidade pode se espalhar por vários quilômetros em poucas horas. Os sistemas de contenção de óleo disponíveis normalmente se movem lentamente enquanto recuperam o óleo derramado. Desta forma, mesmo eles sendo totalmente operacionais, não será possível recolher mais do que uma pequena parte do óleo derramado. Esta é a razão principal porque a contenção e a recuperação de óleo em mar aberto dificilmente alcançará proporção maior que 10 a 15% do óleo derramado.

Dispersantes químicos

Os dispersantes são formulações químicas de natureza orgânica que visam emulsionar o petróleo na água sob forma de pequenas gotículas que facilitam a

biodegradação pela flora e fauna, devido à diminuição da relação volume/superfície entre óleo e água, acelerando o processo de autodepuração. São constituídos por ingredientes ativos, denominados surfactantes, e por solventes da parte ativa que permitem a sua difusão no óleo.

O uso de dispersantes químicos pode evitar a chegada do óleo em locais de maior relevância ecológica/econômica, visando a proteção de recursos naturais e sócio-econômicos sensíveis como os ecossistemas costeiros e marinhos.

Os dispersantes são potencialmente aplicáveis em situações de derramamento de óleo, porém só deverá ser utilizado se resultar em prejuízo ambiental menor quando comparado a um derrame sem qualquer tratamento, ou se outra medida adicional à contenção não for eficaz. Sua aplicação, entretanto, está associada ao registro do produto junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), e deve obedecer aos critérios dispostos na legislação vigente específica (resolução CONAMA n° 269 de 14/09/2000).

A eficiência do dispersante, entre outras considerações, está relacionada aos processos de intemperização do óleo no mar. Óleos intemperizados tornam-se mais viscosos e podem também sofrer emulsificação, que diminuem a eficiência desses agentes químicos. Dessa forma, caso seja pertinente a utilização do dispersante e considerando o cenário do derrame, sua aplicação, tanto quanto possível, deve ser realizada durante as operações iniciais do atendimento, criteriosa e preferencialmente nas primeiras 24 horas.

Quando um dispersante é aplicado sobre uma mancha, as gotículas de óleo presentes são circundadas pelas substâncias surfactantes, estabilizando a dispersão, o que ajuda a promover uma rápida diluição pelo movimento da água. O dispersante reduz a tensão superficial entre a água e o óleo, auxiliando a formação de gotículas menores, as quais tendem tanto a se movimentar na coluna d'água, como permanecer em suspensão na superfície, acelerando o processo natural de degradação e de dispersão, favorecendo desta forma a biodegradação.

Os dispersantes, quando aplicados apropriadamente, podem ajudar a transferir para a coluna d'água um grande volume de óleo que estava na superfície, obtendo-se resultados com maior rapidez do que os métodos de remoção mecânicos.

Os dispersantes, em geral, têm pouco efeito sobre óleos viscosos, pois há uma tendência do óleo se espalhar na água antes que os solventes e agentes surfactantes possam penetrar na mancha. A maioria dos produtos atualmente disponíveis possui efeito reduzido se aplicados quando o processo de intemperização já tiver sido iniciado e se a mancha estiver sob o aspecto de emulsão viscosa (*mousse*).

Queima in situ

Queima *in situ* é o nome dado ao processo de queima do óleo derramado no mar, no local ou próximo ao local do derramamento. Existem vários problemas que limitam o uso desta técnica, incluindo: o perigo da fonte de ignição, a formação de resíduos densos que podem afundar e questões de segurança. Este método ainda não foi regulamentado no Brasil, porém é utilizado há mais de 30 anos em países como Suécia, EUA, Canadá e Inglaterra.

Alguns critérios devem ser levados em consideração antes de se iniciar a queima, como por exemplo, o tipo de barreira que está sendo utilizada (deve ser do tipo antifogo), a distância da mancha pra embarcação avariada e se existe alguma população próxima do local, a toxicidade da fumaça que será gerada, o tipo de óleo derramado e os resíduos que poderão ser gerados, condições de tempo e mar.

O resíduo gerado da queima *in situ* é extremamente viscoso e de difícil recuperação no mar e na costa. A maior preocupação é com a possibilidade do resíduo afundar podendo causar danos às espécies de fundo, sendo a recuperação do local ainda mais difícil.

Absorventes

O absorvente de petróleo e derivados é altamente eficiente para limpeza ou remoção de óleo em terra ou água. Podem se apresentar na forma granulada, ou envolvidos em tecidos porosos formando "salsichões" ou "almofadas", sendo aplicados diretamente sobre o óleo. Podem absorver até 25 vezes seu próprio peso em petróleo e seus derivados. Os absorventes sintéticos de óleo não absorvem água, flutuam, podem ser torcidos e reaproveitados. Diversos produtos estão disponíveis no mercado, sendo

que a escolha do melhor absorvente deve ser feita criteriosamente, levando-se em conta as características do óleo, do ambiente e do próprio absorvente.

Remoção manual

É um método de limpeza mais trabalhoso, porém bastante eficaz em ambientes como costões rochosos, praias e principalmente em locais restritos como conjunções de rochas, fendas, poças de maré, e até mesmo em áreas maiores como praias de areia.

A retirada do óleo é feita manualmente através de utensílios como pás, rodos, baldes, latas, carrinhos de mão, etc, não causando nenhum dano adicional ao ambiente afetado pelo derramamento.

Biodegradação/ Biorremediação

A biodegradação é o resultado da oxidação de certos componentes do óleo derramado, por microrganismos como bactérias, fungos, algas unicelulares e protozoários. É um mecanismo natural de limpeza e remoção do óleo que possui eficiência variável, de acordo com as características físicas do próprio óleo, e também do ambiente, como temperatura, níveis de microrganismos, nutrientes e oxigênio presentes no local. Este procedimento é normalmente priorizado em muitos casos, uma vez que não causa danos adicionais à comunidade. No entanto, normalmente, conjuga-se a este procedimento outros métodos de limpeza.

"Após o acidente com o petroleiro Exxon Valdez, em que o óleo derramado no mar atingiu 15% da costa do golfo do Alasca, e a Guerra no Golfo, que formou 330 lagos de óleo no Kuwait, os processos de degradação biológica, chamados, em conjunto, de biorremediação, receberam maior atenção. Tais processos surgiram a partir de estudos de decomposição e detoxificação de pesticidas em solos e, mais tarde, foram propostos como promissores para a recuperação de áreas costeiras atingidas por derrames de petróleo. A tecnologia de biorremediação usa, para a remoção de poluentes, o potencial fisiológico de bactérias. Estas transformam o petróleo em biomassa, água, dióxido de carbono e outros compostos. O objetivo principal da biorremediação é minimizar o impacto das substâncias recalcitrantes no ambiente, criando condições favoráveis ao crescimento e à atividade bacterianas. A bioestimulação (adição de

fertilizantes) e a bioamplificação (semeadura de número expressivo de bactérias hidrocarbonoclásticas) podem ser consideradas abordagens gerais nessa tecnologia. Os resultados desses estudos e de inúmeros outros, ao redor do mundo, deixam claro que as técnicas convencionais de limpeza das marés negras podem e devem ser complementadas com a biorremediação. Em grandes acidentes, mesmo com a aplicação adequada das técnicas mecânicas hoje existentes, ainda resta uma fração de óleo oxidado pela luz solar. Essa fração fica disponível para a biota e precisa ser degradada para que o ecossistema não fique impactado. A biorremediação, portanto, multiplica a capacidade de depuração do ambiente, além de permitir o restabelecimento da vida animal e vegetal e o mapeamento de áreas de risco" (CAPREZ *et al.*, 2002).

III.2. Biorremediação

Uma técnica de remediação de ambientes contaminados, relativamente nova, propõe a aceleração do processo de degradação natural do petróleo, por microrganismos que utilizam os hidrocarbonetos como fonte de carbono em seus processos metabólicos (SOUZA e TRIGÜIS, 2005). O sucesso da aplicação da biorremediação depende da presença de microrganismos específicos e de condições ambientais adequadas, para que a biodegradação ocorra. Os microrganismos devem ser capazes de metabolizar os constituintes do petróleo. Em muitos casos, esses organismos já fazem parte da microflora local em outras circunstâncias, em que se verifica sua carência, precisam ser adicionados (microrganismos exógenos). Parâmetros ambientais podem ser alterados ou controlados para otimizar o crescimento e as atividades metabólicas dos microrganismos. Algumas dessas condições são: presença de oxigênio e de nutrientes contendo compostos de nitrogênio e fósforo, e pH (ADAMASSU e KORUS, 1996).

Compostos de nitrogênio são essenciais na biossíntese de proteínas e ácidos nucléicos pelos microrganismos. O fósforo é um componente vital dos ácidos nucléicos, dos fosfolipídios que compõem as membranas celulares e também desempenha um papel central no processo de transferência de energia dentro da célula (ROSENBERG *et al.*, 1996).

Sendo assim, a biorremediação de uma área contaminada pode ser realizada através de dois processos:

- Bioestimulação, que consiste na correção adequada das condições ambientais (pH, nutrientes, etc) para estimular a biodegradação de hidrocarbonetos pelos microorganismos nativos.
- Bioaumento, que consiste na adição no meio ambiente de microorganismos selecionados capazes de degradar hidrocarbonetos.

III.2.1. As vantagens da Biorremediação

A biorremediação tem como vantagem:

- baixo custo, pois utiliza sistemas biológicos cujo custo é reduzido;
- a eliminação de custos de transportes quando implementada em campo (*in situ)*;
- remove mais rapidamente os hidrocarbonetos do meio ambiente, reduzindo o impacto sobre a fauna e a flora;
- é ecologicamente correta, pois não altera o equilíbrio dos ecossistemas, visando somente a biodegradação dos compostos poluentes;

III.2.2. Biorremediação de hidrocarbonetos

Biorremediação tem se tornado um dos principais métodos empregados na recuperação de ambientes contaminados com petróleo (FICKERS *et al.*, 2005).

III.2.2.1. Microorganismos capazes de promover a biorremediação de hidrocarbonetos

Muitos microorganismos incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras são conhecidos por sua capacidade de degradar hidrocarbonetos (CHAILLAN *et al*., 2004). Esses microorganismos que têm sido isolados de reservatório de petróleo ou locais contaminados com óleo são predominantemente aeróbicos.

Esses microorganismos são capazes de degradar vários tipos hidrocarbonetos – de cadeia curta, de cadeia longa e numerosos compostos aromáticos, incluindo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (RON e ROSENBERG, 2002). A

máxima degradação normalmente ocorre para os hidrocarbonetos saturados (*n*-alcanos, isoalcanos, isoprenóides), enquanto a degradação de componentes aromáticos é menor.

Baseado em trabalhos publicados na literatura, as bactérias mais importantes capazes de degradar hidrocarbonetos tanto em ambientes marinhos como terrestres são do gênero *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas, Micrococcus, Brevibacterium, Corynebacterium* e *Vibrio*, sendo esta última limitada somente a ambientes marinhos (ATLAS, 1981; LEAHY e COLWELL, 1990).

Em relação aos fungos filamentosos e leveduras, *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*, são as espécies mais isoladas de ambientes marinhos; e *Trichoderma* e *Mortierella*, de ambientes terrestres. Já as espécies *Aspergillus* e *Penicillium* são frequentemente isoladas de ambos ambientes (ATLAS, 1981; LEAHY e COLWELL, 1990).

CHAILLAN *et al.* (2004) isolaram 33 espécies de uma área contaminada com petróleo na Indonésia e verificaram que se tratava de 8 bactérias, 21 fungos filamentosos e 4 leveduras. A Tabela III.5 mostra as estirpes encontradas.

Tabela III.5. Estirpes degradadoras de petróleo (CHAILLAN *et al*., 2004).

Número da estirpe	Identificação e número de acesso ao banco de genes
Bactéria	
BHT 14	BHT 14 *Brevibacterium* sp. (novas espécies)
BAH 2	BAH 2 *Gordonia terrae* X 81922
BAH 5	BAH 5 *Aeromicrobium erythreum* AF 005021
BAH 6b	BAH 6b Nova taxonomia, próxima de *Actinomyces/Thermoleophilum*
BAH 11	BAH 11 *Dietzia* sp. grupo E9-2
BAH 13	BAH 13 *Gordonia hydrophobica* X 87340
BAH 18	BAH 18 *Burkholderia thailandensis* U 91838
BAH 23	BAH 23 *Mycobacterium* sp. (novas espécies)
Levedura	
LAH 1	LAH 1 *Yarrowia lipolytica* AF 335977
LAH 2	LAH 2 *Candida viswanathii* CVU 45752
LAH 3	LAH 3 *Candida palmioleophila* CPU 45758
LAH 5	LAH 5 *Pichia guilliermondii* AF 257270/*Candida fukuyamaensis* CFU 62311 /*C. xestobii* CXU 45707
Fungos	
CT 1	CT 1 *Aspergillus fumigatus* Fresenius
CT 2	CT 2 *Fusarium oxysporum* Desmazières
CT 4	CT 4 *Penicillium oxalicum* Currie & Thom
CT 8	CT 8 *Penicillium simplicissimum* (Oudemans) Thom
CT 9	CT 9 *Penicillium verruculosum* Peyronel
CT 11	CT 11 *Aspergillus clavatus* Desmazières
CT 16	CT 16 *Penicillium montanense* M. Christensen & Backus
CT 19	CT 19 *Penicillium pinophilum* Hedgcock
CT 99	CT 99 *Aspergillus sydowii* (Bainier & Sartory) Thom & Church
CAH 2	CAH 2 *Amorphoteca resinae* Parbery S
CAH 3	CAH 3 *Neosartorya fischeri* (Wehmer) Malloch & Cain
CAH 4	CAH 4 *Penicillium janthinellum* Biourge
CAH 5	CAH 5 *Aspergillus niger* Van Tieghem
CAH 7	CAH 7 *Paecilomyces variotii* Bainier
CAH 9	CAH 9 *Talaromyces flavus* (Klöcker) Stolk & Samson
CAH 11	CAH 11 *Graphium putredinis* (Corda) Hughes
CAH 13	CAH 13 *Cunninghamella echinulata* (Thaxter) Thaxter
CAH 22	CAH 22 *Penicillium restrictum* Gilman & Abbott
CAH 33	CAH 33 *Aspergillus terreus* Thom
CAH 44	CAH 44 *Eupenicillium ochrosalmoneum* Scott & Stolk
CAH 55	CAH 55 *Fusarium decemcellulare* Brick

Fonte: adaptado de CHAILLAN *et al*., 2004.

III.2.2.2. Fatores que influenciam a biorremediação de hidrocarbonetos

Fatores que influenciam as taxas de crescimento microbiano e de atividade enzimática afetam a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos. A persistência dos compostos poluentes depende da quantidade e qualidade da mistura dos hidrocarbonetos e das propriedades do ecossistema afetado. Em um ambiente os hidrocarbonetos do petróleo podem persistir indefinidamente, enquanto sob outras condições os mesmos hidrocarbonetos podem ser completamente degradados em algumas horas ou dias (ATLAS, 1981).

Estado físico do óleo

O estado físico dos hidrocarbonetos do petróleo tem grande efeito na biodegradação. Concentrações muito baixas de hidrocarbonetos são solúveis em água, mas a maior parte dos incidentes de derramamento de petróleo ocorre excedendo os limites de solubilidade. A taxa de espalhamento determina em parte a área superficial de óleo disponível para a colonização de microorganismos capazes de degradar hidrocarbonetos; em sistemas aquáticos, o óleo normalmente espalha formando uma fina camada. A taxa de espalhamento é reduzida em baixas temperaturas por causa da viscosidade do óleo. Em solos, os hidrocarbonetos são absorvidos pelas raízes de plantas e partículas presentes no solo, limitando o espalhamento (ATLAS, 1981).

Temperatura

A temperatura influencia a biodegradação de petróleo devido aos seus efeitos sobre a natureza física e química da composição do óleo, taxa de metabolização de hidrocarbonetos e composição da comunidade microbiana. A baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta, a volatilização de compostos tóxicos de baixo peso molecular é reduzida e sua solubilidade em água diminui, retardando o processo de biodegradação. As taxas de degradação geralmente decaem com a redução da temperatura e acredita-se que isso ocorra principalmente devido a redução das taxas de atividade enzimática. Altas temperaturas aumentam as taxas de metabolização, normalmente na faixa de 30 a 40ºC, acima disso a sensibilidade da membrana a hidrocarbonetos tóxicos é aumentada (LEAHY e COLWELL,1990).

Oxigênio

A etapa inicial no catabolismo de hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos por bactérias e fungos envolve a oxidação do substrato por oxigenases, para tanto o oxigênio molecular é requerido. Condições aeróbias são, então, necessárias para que esta rota de oxidação microbiana de hidrocarbonetos ocorra no ambiente. Condições limitantes de oxigênio normalmente não existem nos níveis mais próximos da superfície no mar e em ambiente de água doce. Contudo, sedimentos aquáticos são geralmente atóxicos. A disponibilidade de oxigênios em solo depende da taxa de consumo do oxigênio por microorganismos e do tipo se solo (LEAHY e COLWELL,1990).

Nutrientes

A presença de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos que contenham baixa concentração de nutrientes inorgânicos geralmente produz alta relação C/N ou C/P, o que desfavorece o crescimento microbiano. Sabe-se que a disponibilidade de nitrogênio e fósforo limita a degradação de hidrocarbonetos por microorganismos em ambientes aquáticos. A correção da relação C/N/P através da adição de nitrogênio e fósforo na forma de fertilizante estimula a biodegradação de óleo cru (LEAHY e COLWELL,1990).

pH

Ao contrário da maior parte dos ambientes aquáticos, o pH do solo pode variar bastante, em torno de 2,5 até 11,0. A maioria das bactérias heterotróficas e fungos são favorecidos em pH próximos da neutralidade, sendo os fungos mais tolerantes a condições ácidas. Em pH extremos, como ocorre em alguns solos, verifica-se uma influência negativa na habilidade da população microbiana em degradar hidrocarbonetos (LEAHY e COLWELL,1990).

III.3. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um microrganismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos, anteriormente conhecida como *Candida lipolytica*. Foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica* (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Essa levedura é bastante diferente dos modelos celulares mais estudados *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (consideradas leveduras "convencionais") em relação à fisiologia, genética e biologia molecular e, portanto, pertence ao grupo das leveduras "não-convencionais", sendo a espécie mais estudada desse grupo (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Yarrowia lipolytica pode ser facilmente isolada de ambientes ricos em lipídeos e proteínas, como produtos lácteos, saladas de carne ou camarão, em aves cruas, no meio ambiente (como a Baía de Guanabara, RJ) e em ambientes com elevadas concentrações de sais, como águas do mar hipersalinas, dentre outros (BUTINAR *et al*., 2005; AMARAL *et al*., 2006; ISMAIL *et al*., 2001; VASDINYEI e DEAK, 2003)

DUJON *et al.* (2004), estudando a evolução de leveduras, determinaram a seqüência genômica de vários microrganismos, incluindo todo o cromossomo 6 de *Yarrowia lipolytica*. Desta forma, possibilitou estudos de vários genes responsáveis pela expressão de proteínas, enzimas e até mesmo das moléculas de biossurfactantes produzidas por *Y. lipolytica* que tenham interesse industrial, permitindo aumentar a expressão de seus produtos metabólicos via engenharia genética. Hoje ela representa uma espécie aceitável para técnicas de biologia molecular e genética.

Y. lipolytica já foi utilizada em aplicações industriais como na produção de proteínas de microrganismos unicelulares, *flavour* de pêssego e ácido cítrico, em processos considerados pela *American Food and Drug Administration* como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (TSUGAWA *et al*., 1969). Além disso, excreta várias enzimas, como proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (NICAUD *et al*., 2002).

A gama de substratos utilizados por *Yarrowia lipolytica* inclui alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares (principalmente glicose).

III.3.1. Consumo de substratos hidrofóbicos

Como a levedura *Y. lipolytica* é geralmente isolada de meios contendo fonte de carbono lipídica, tais como ambientes poluídos, como a Baía de Guanabara (HAEGLER e MENDONÇA-HAEGLER, 1981), é particularmente adaptada a substratos hidrofóbicos.

A literatura tem reportado a utilização de diferentes substratos hidrofóbicos por *Y. lipolytica*, mostrando a versatilidade desta espécie. PAREILLEUX (1979) cresceu *Candida lipolytica* em *n*-alcanos como fonte de carbono. ZINJARDE e PANT (2002) mostrou que *Y. lipolytica* NCIM 3589 é capaz de consumir óleo cru e alcanos (C_{10} – C_{18}).

CIRGLIANO e CARMAM (1984) mostraram que a levedura *Y. lipolytica* é capaz de crescer em diferentes fontes de carbono tais como: hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão. SARUBBO *et al*. (2007) cresceram *C. lipolytica* em meio contendo óleo de canola.

O catabolismo de substratos hidrofóbicos, tais como alcanos, ácidos graxos e triglicerídeos nas leveduras, como em *Yarrowia lipolytica*, é bastante complexo envolvendo várias vias metabólicas ocorrendo em diferentes compartimentos celulares (FICKERS *et al*., 2005). A Figura III.10 resume essas vias metabólicas.

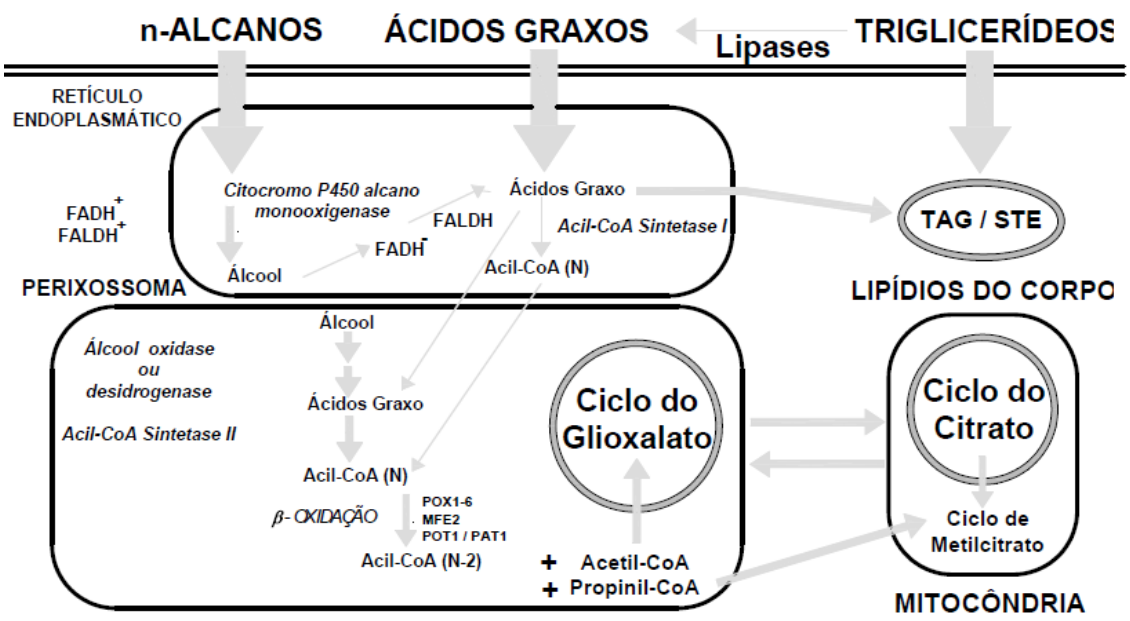

Figura III.10. Principais vias metabólicas e compartimentos celulares envolvidos na degradação de compostos hidrofóbicos (adapatado de FICLERS *et al.*, 2005).

Os triglicerídeos são primeiramente hidrolisados por enzimas lipolíticas (lipases) em ácidos graxos livres, os quais entram na célula; já os alcanos passam pela membrana celular diretamente. A primeira oxidação dos alcanos em seu álcool correspondente ocorre no retículo endoplasmático pela citocromo P450 monooxigenase, sendo este posteriormente convertido em seu ácido graxo correspondente por dois passos. Os ácidos graxos são então ativados no retículo endoplasmático, no peroxissoma, antes de entrar na via da β-oxidação dos ácidos graxos, que resulta em acetil-CoA e propionil-CoA (no caso de alcanos de cadeias ímpares). Dependendo das condições ambientais as células podem armazenar os ácidos graxos diretamente (FICKERS *et al.*, 2005). Os intermediários metabólicos produzidos na β-oxidação entram no ciclo do glioxalato, o qual interage com o ciclo do ácido cítrico e o ciclo de metilcitrato na mitocôndria.

Contudo, uma das principais etapas das vias de degradação de compostos hidrofóbicos em leveduras é a absorção e o transporte desses substratos ao local da primeira oxidação, no qual os mecanismos são ainda desconhecidos. Como esses substratos não são miscíveis em água, sua absorção requer modificações morfológicas e fisiológicas, especialmente nas propriedades de adesão celular (superfície hidrofóbica) ou na produção de emulsificantes (surfactantes) (FICKERS *et al.*, 2005).

III.3.2. A superfície celular

Acredita-se que, evolutivamente, microrganismos que vivem em meios aquosos onde a fonte de carbono é hidrofóbica e, portanto, se encontra dispersa no meio, sob a forma de gotas, tenham desenvolvido mecanismos para facilitar o acesso a esse substrato devido à pequena probabilidade de contato das gotas de óleo, em constante movimento, com os microrganismos.

Duas hipóteses têm sido formuladas para explicar o transporte desses substratos hidrofóbicos para dentro da célula, uma delas é a produção de biossurfactantes e a outra é a interação dos substratos com a superfície celular da levedura, na qual há um aumento nas propriedades apolares, tornando-as mais hidrofóbica (KIM *et al*., 2000). A Figura III.11 mostra a interação da levedura *Y. lipolytica* com substratos hidrofóbicos.

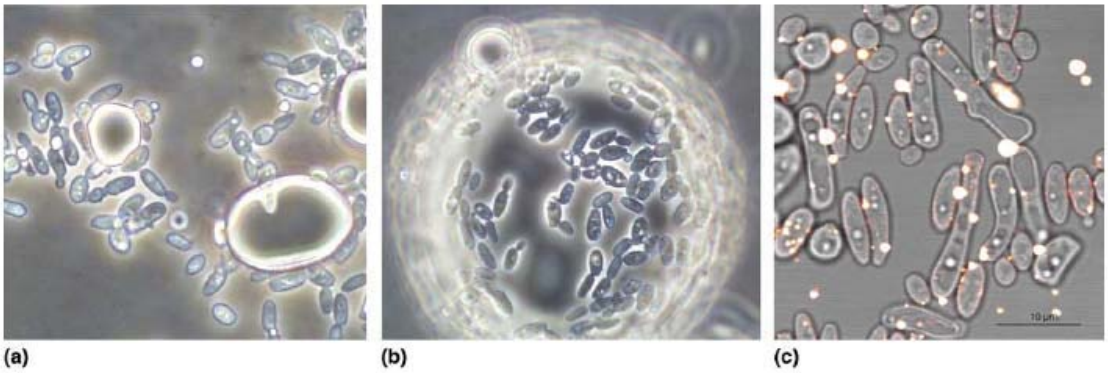

Figura III.11. Interação das células de *Y. lipolytica* com substrato durante crescimento com substratos hidrofóbicos. Adesão celular de *Y. lipolytica* a pequenas (a) e grandes (b) gotas de hexadecano e (c) Adesão da gota de óleo na superfície celular durante crescimento da *Y. lipolytica* em ácido rinoléico como substrato (FLICKERS *et al*., 2005).

O contato direto entre as gotas de óleo e as células parece ser o mecanismo pelo qual a maior parte do substrato é transportada. Observações em microscópio mostram a adesão de gotas de compostos hidrofóbicos na superfície das células de *Y. lipolytica*, como se pode observar na Figura III.11. A área de contato entre o microrganismo e o substrato inclui tanto as grandes gotas de substrato onde o microrganismo se adere como as pequenas gotas que são adsorvidas na superfície celular (GUTIERREZ e ERICKSON, 1977).

Portanto, a assimilação de substratos hidrofóbicos pode ocorrer através de adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pode ser mediada por um surfactante.

No caso de adsorção direta, muitos mecanismos podem estar envolvidos, como interações hidrofóbicas, interações de *Lewis* (ácido ou base), interações eletrostáticas ou de *van der Waals*. Alguns testes têm sido desenvolvidos para caracterizar propriedades hidrofóbicas (MATH, *microbial adhesion to hydrocarbons*, adesão microbiana a hidrocarbonetos) (ROSENBREG, 1991) ou propriedades doadoras ou aceptoras de elétrons (ácido-base de Lewis) (MATS, *microbial adhesion to solvents*, adesão microbiana a solventes) (BELLON-FONTAINE *et al*., 1996) dos microrganismos. Esses testes e alguns outros (VAN DER MEI *et al*., 1995) dão informações sobre as propriedades da superfície das células e podem ser úteis para prever o comportamento microbiano frente a uma superfície.

Para se estudar os mecanismos de interação entre as células e a fase hidrofóbica é necessário analisar as propriedades de superfície de ambos. Certamente, as propriedades de superfície dos microrganismos dependem da espécie e cepa utilizada, do ambiente que a cerca e da fonte de carbono presente no meio. Como a produção de agentes emulsionantes pelo microrganismo também pode interferir nas interações, é importante que se investigue a possível excreção de tais compostos no meio de cultivo.

AMARAL (2007) cresceu *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em sistema bifásico, contendo perfluorcarboneto (PFC) adicionado ao meio de cultivo e verificou que as células de *Y. lipolytica* apresentaram uma alta afinidade pelo PFC, o que causou uma partição das células para a fase do PFC. Além disso, a cepa apresentou alta adesão a superfícies com características bastante diferentes, como poliestireno e vidro. AMARAL (2007) realizou testes para caracterização da superfície celular desta cepa e definiu a superfície das células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 como hidrofílica, apresentando, no entanto, alta afinidade com superfícies, líquidos ou moléculas hidrofóbicas quando imersas em água.

Segundo AMARAL (2007) a interação entre as células e as superfícies ou compostos hidrofóbicos parece ser mediado por proteínas ou glicoproteínas da parede celular. Além disso, as interações observadas entre as células e solventes apolares estão ligadas às interações apolares ou *Lifshitz-van der Waals*.

III.3.3. A produção de biossurfactante

Yarrowia lipolytica é capaz de produzir moléculas com propriedades tensoativas, como mostram alguns trabalhos da literatura. Estes trabalhos apontam uma ampla diversidade entre as fontes de carbono utilizadas para produção de biossurfactante.

PAREILLEUX (1979) isolou compostos tenso-ativos a partir da levedura *Candida lipolytica* em meio contendo *n*-alcanos como fonte de carbono, mas quando foi cultivada em meio contendo glicose a levedura não produziu nenhum bioemulsificante. Em um estudo similar, ZINJARDE e PANT (2002) mostraram que a biossíntese de surfactante por *Y. lipolytica* NCIM 3589 utilizando como fonte de carbono substratos solúveis (glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool) não é viabilizada. Entretanto, em meio contendo óleo cru e alcanos (C_{10} – C_{18}) detectou-se a produção de bioemulsificante. Observações similares foram obtidas por KIM e REHM (1982).

CIRIGLIANO e CARMAM (1984) mostraram que a levedura *Y. lipolytica* produz biossurfactantes a partir de diferentes fontes de carbono tais como: hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão, sendo que com hexadecano houve maior produção de biossurfactante.

Em 2001, SARUBBO *et al*. produziram biossurfactante utilizando glicose como fonte de carbono a partir da levedura *C. lipolytica* IA 1055, o qual apresentou uma alta atividade de emulsificação. Estes autores mostraram que não é necessária a presença de hidrocarbonetos para indução da biossíntese de surfactantes. AMARAL *et al.* (2006) utilizaram também como fonte de carbono a glicose para a síntese do biossurfactante denominado Yansan, a partir de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.

FONTE (2008) utilizou além de glicose fontes de carbono renováveis como o suco de caju clarificado e glicerol, proveniente da produção de biodiesel, para a produção de biossurfactante a partir de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.

Apesar da produção de biossurfactantes ocorrer na presença de fontes de carbonos solúveis em água, como os açúcares, vários estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados (HOMMEL *et al*., 1994). Muitos trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel em água e um carboidrato, como constituintes do meio de cultura.

Os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo microorganismo para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto que os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica do biossurfactante. As espécies de *Candida* são capazes de incorporar diretamente ácidos graxos para a produção de biossurfactante (WEBER *et al*., 1992).

As vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para produção de biossurfactante são diversas e dependem da natureza da principal fonte de carbono utilizada no meio de cultivo.

III.3.4. Aplicação de *Y. lipolytica* em processos de biorremedição

Devido a sua habilidade de degradar alcanos, ácidos graxos e óleo, não é surpreendente que cepas de *Y. lipolytica* emirjam de vários estudos independentes como agente promissor no tratamento tanto da poluição causada por óleos minerais como da poluição causada por resíduos da indústria de petróleo (FICKERS *et al*., 2005).

A água residual das indústrias de processamento de óleo é uma importante fonte de poluição da água quando lançada em rios locais sem tratamento porque contém gordura, açúcares, fosfato, fenol e metais (FICKERS *et al*., 2005).

Diferentes estudos têm reportado bons resultados no uso de água residual das indústrias de processamento de óleo como substrato para crescimento de *Y. lipolytica*, resultando em uma significante redução da demanda química de oxigênio (DQO), juntamente com a produção de enzimas lipolíticas e biomassa. SCIOLI e VOLLARO (1997) reportaram a redução de aproximadamente 80% da DQO em águas residuais do processamento do óleo de oliva após 24 horas de fermentação. OSWALL (2002) verificou a redução de mais de 90% da DQO em efluente da indústria de processamento de óleo de palma.

Porém, a maior parte dos estudos realizados utilizando *Y. lipolytica* como agente biorremediador são relacionados a biodegradação de hidrocarbonetos. KOMAGATA *et al*. (1964) examinaram a habilidade de cerca de 500 leveduras em degradar hidrocarbonetos e perceberam que 56 são capazes de utilizar esses hidrocarbonetos, quase todas pertencentes ao gênero *Candida*.

IJAH (1998) isolou duas bactérias (*Serratia marcescens* e *Acinetobacter calcoaceticus*) de solo contaminado com óleo e uma levedura (*Candida tropicalis*) de solo não contaminado e estudou suas capacidades de degradação de óleo cru em *pipeline*. *Candida tropicalis* apresentou maior eficiência na remoção do óleo cru, sendo capaz de degradar 69% do óleo em 16 dias.

KIM *et al*. (1999) isolaram uma espécie de levedura de uma área industrial poluída com óleo e verificaram que esta levedura apresentava alta capacidade de degradação de hidrocarbonetos alifáticos. Analisando o conteúdo genético de tal microorganismo pode verificar que se tratava de *Yarrowia lipolytica*, sendo este microrganismo capaz de degradar 94% dos hidrocarbonetos alifáticos em 3 dias a 25ºC.

ZINJARDE & PANT (2002) isolaram 17 bactérias e leveduras de ambiente marinho tropical e verificaram que esses microorganismos eram capazes de degradar óleo cru. As estirpes de leveduras se mostraram importantes degradadoras das frações alifáticas, sendo todas pertencentes ao gênero *Candida*. Usando testes bioquímicos foram identificadas como: *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, *C. tropicalis* and *C. intermedia*. *Y. lipolytica* foi a que apresentou melhor capacidade degradadora utilizando 78% da fração alifática do óleo cru a 30ºC em 5 dias.

III.3.5. Consumo de glicerol por *Y. lipolytica*

Diversos estudos têm mostrado que *Y. lipolytica* também é capaz de degradar glicerol convertendo-o em produtos de interesse como, por exemplo, ácido cítrico, ácido pirúvico e lipídeos.

PAPANIKOLAOU *et al.* (2002) cultivaram *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 em glicerol cru (proveniente da produção de biodiesel) sob condições limitantes de nitrogênio e verificaram que em elevadas concentrações iniciais de glicerol ocorreu produção de aproximadamente 35 g/L de ácido cítrico com um rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,42 a 0,44 g/g. RYMOWICZ *et al.* (2006) também utilizaram glicerol cru como substrato para 3 cepas mutantes de *Y. lipolytica* e observaram que para concentração inicial de 200 g/L de glicerol, *Y. lipolytica* 1.31 foi capaz de produzir 124,5 g/L de ácido cítrico, obtendo um rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,62 g/L e uma produtividade (Q_P) de 0,88 g/L.h.

Y. lipolytica sob condições limitantes de crescimento por tiamina é capaz de produzir ácido pirúvico. Sendo assim, MORGUNOV *et al.* (2004) utilizaram uma cepa de *Y. lipolytica* autotrófica em relação a tiamina para produzir ácido pirúvico a partir de glicerol. A cepa *Y. lipolytica* 374/4 produziu 61,3 g/L de ácido pirúvico a uma taxa específica de produção de 76,3 mg de ácido/g de células.h.

PAPANIKOLAOU e AGELLIS (2002) observaram que em condições contrários as utilizadas para produção de ácido cítrico, *Y. lipolytica* LGAM S(7)1 foi capaz de acumular elevadas quantidades de lipídios (aproximadamente 3,5 g/L, 43% p/p de lipídios por p.s. de células). A máxima produtividade volumétrica (Q_P) obtida foi de 0,12 g de lipídios/L.h.

Além disso, o glicerol também tem sido usado por *Y. lipolytica* como fonte de carbono para produção de biossurfactantes. FONTES (2008) utilizou glicerol bruto (proveniente da produção de biodiesel) como substrato para o crescimento celular e produção de biossurfactante e obteve resultados satisfatórios, com uma redução da tensão superficial de 22mN/m e um índice de emulsificação de 70,22%.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados foram: peptona e extrato de lêvedo (*Oxoid* - Hampshire, UK), glicose (*Reagen* – RJ, Brasil), agar-agar (*Vetec* – RJ, Brasil), glicerol (*Vetec* – RJ, Brasil).

O óleo cru utilizado foi gentilmente cedido pela Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS), tendo como principais características: Petróleo Marlin: 18,93 °API; peso molecular ≈ 5000; asfaltenos = 3,1%; relação resinas / asfaltenos = 8,1; relação saturados / aromáticos = 1,6; 2,66% de N, S e O.

A água do mar utilizada foi gentilmente cedida pela empresa Subsea 7 do Brasil, sendo obtida de alto mar no Campo de Camarupim, bacia do Espírito Santo – RJ, Brasil.

Os reagentes utilizados foram: clorofórmio (*Vetec* – RJ, Brasil) e hexadecano (*Sigma-Aldrich CO* (MO, USA)).

Os *kits* enzimáticos para dosagem de glicose e glicerol foram fornecidos pela Merck e Laborlab, respectivamente.

As enzimas comerciais utilizadas no tratamento enzimático foram: amiloglucosidade fúngica de *Rhizopus sp*. e Pronase (*Sigma-Aldrich CO* (MO, USA)). A proteína padrão utilizada foi albumina de soro bovino (BSA) (*Sigma-Aldrich CO* (MO, USA)).

Foram utilizadas membranas em éster de celulose 0,45 μm (*Millipore*, S.P., Brasil).

IV.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises foram:

1) Centrífuga *Fanem* modelo *204-NR*;
2) Centrífuga *Eppendorf* modelo *Centrifuge 5804R*;
3) Espectrofotômetro *Hach DR/4000 UV*;

4) Capela de fluxo laminar equipada com luz UV – *BioFlux II 90A*;
5) Capela de exaustão de gases *Quimis* modelo *Q216-11*;
6) Incubador com agitação (*shaker*) *Certomat BS-1*;
7) Vortex *IKA* modelo *MS2 Minishaker*;
8) Microscópio ótico *Nikon* modelo *Eclipse E200* acoplado a câmera refrigerada *Evolution VF*;
9) Banho-maria com agitação *Quimis* modelo *Q-226M*;
10) pHmetro de bancada digital *Digimed* modelo *DM-22*;
11) Tensiômetro *NIMA DST 9005* (*NIMA Technology*, Ltd);
12) Cromatógrafo à Gás (CG) *Hewlett Packard* (Palo Alto, CA, USA) modelo *6890 Plus*;
13) Cromatógrafo Gasoso *Agilent* 6890N acoplado a um Espectrômetro de Massas *Agilent 5973* (CG/MS).
14) Microscópio Eletrônico modelo *Jeol 1200 EX*.
15) Ultramicrótomo *Reichert*.

IV.3. Meios de cultivo

Os meios de cultivo utilizados nos experimentos foram:

- YPD ("*Yeast Extract, Peptone, Dextrose*") – composição (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2% e glicose 2%.

- Meio Mineral – composição (em g/L): KH_2PO_4, 7; Na_2HPO_4, 2,5; $MgSO_4.7H_2O$, 1,5; $CaCl_2$; 0,15; $FeCl_3.6H_2O$, 0,15; $ZnSO_4.7H_2O$, 0,02; $MnSO_4.H_2O$, 0,06 (PAPANIKOLAOU *et al*., 2002; PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2002)

- Água do Mar - obtida de alto mar no Campo de Camarupim, bacia do Espírito Santo – RJ, Brasil. Em média, a água do mar de todo o mundo tem uma salinidade de 35 g/L (3,5% p/v).

A Tabela IV.1 apresenta os principais íons salinos presentes na água do mar e suas porcentagens em massa.

Tabela IV.1. Principais íons salinos presentes na água do mar.

Íons	% m/m
Cloreto (Cl^-)	55,04
Sódio (Na^+)	30,61
Sulfato (SO_4^{2-})	7,68
Magnésio (Mg^{2+})	3,69
Cálcio (Ca^{2+})	1,16
Potássio (K^+)	1,10

IV.4. Microrganismos

A levedura empregada no presente trabalho é uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 IMUFRJ 50682 (Figura IV.1) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

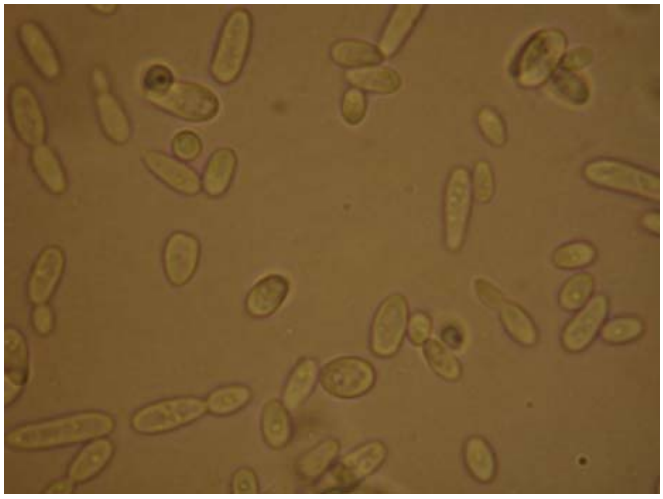

Figura IV.1. Morfologia microscópica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (aumento de 1000x).

As cepas *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC20460; CLIB89) e *Saccharomyces cerevisiae* mh1 foram cedidas gentilmente pelo Centro de Engenharia Biológica da

Universidade do Minho (Braga, Portugal) e pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, respectivamente. Essas cepas foram usadas para comparação dos resultados de caracterização da hidrofobicidade celular.

IV.5. Manutenção da cultura

As células foram conservadas a 4ºC após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio YPD contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e agar 2%.

IV.6. Obtenção do inóculo

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (descrito no item IV.5) inoculava-se, de forma estéril com uma alça de platina, 100 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL. Após cerca de 48 horas em um incubador rotatório a 28ºC, 160 rpm, a absorvância (570 nm) de uma alíquota deste cultivo era determinada e, em seguida as células eram centrifugadas de forma estéril a 3.000 *g* por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL de meio de cultivo fresco servindo de inóculo dos experimentos que serão descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter aproximadamente a concentração inicial de células desejada nos meios de cultivo.

IV.7. Experimentos preliminares

Experimentos preliminares foram realizados a fim de estudar a influência da presença de glicose no processo de biodegradação, a produção de biossurfactante e a capacidade biodegradadora de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de meio de cultivo (água do mar) a 28ºC em incubador rotatório (shaker) a 160 rpm. A concentração inicial de células nos experimentos preliminares foi 1,0 ± 0,1 mg/mL. A Tabela IV.2 resume os experimentos realizados. Esses experimentos foram realizados por 120 horas com amostragem diária para

medida de crescimento celular e consumo de glicose (exceto para o experimento 1). O óleo cru remanescente nos experimentos 1 e 3 foi analisado ao final das 120 horas. A tensão superficial dos meios de cultivo foi medida no ínicio e no final de cada experimento.

Tabela IV.2. Experimentos preliminares.

Experimento	Petróleo (%v/v)	Glicose (%p/v)
1	1	-
2	-	2
3	1	2

A fim de verificar se havia mudança na composição do óleo cru antes e após o processo de biorremediação, amostras do óleo cru e do óleo remanescente no experimento 1 foram submetidas à análise de cromatografia gasosa utilizando detector por ionização em chama (CG/DIC) (descrito no item IV.15.3).

IV.8. Estudo de variáveis que influenciam no processo de biodegradação

Para estudar melhor variáveis que influenciam no processo de biodegradação de óleo cru por *Y. lipolytica*, foi aplicado o método do planejamento fatorial 2^4 completo com 8 pontos axiais e 3 pontos centrais, com o uso do programa de computação Statistica 7.0. As variáveis independentes estudadas foram: temperatura, agitação, concentração inicial de células e concentração inicial de petróleo, cujos valores mostrados na Tabela IV.3 representam os limites para cada parâmetro estudado. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo (água do mar) por 120 horas. Foram retiradas amostras diárias para medida de crescimento celular. A tensão superficial e o óleo cru remanescente foram analisados ao final de cada experimento.

As variáveis de resposta utilizadas foram: máxima variação da tensão superficial e máxima porcentagem de remoção de petróleo.

A Tabela IV.4 mostra os experimentos a serem realizados no planejamento experimental. Os experimentos foram realizados aleatoriamente.

Tabela IV.3. Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2^4.

Variavéis independentes	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
Temperatura (ºC)	20	24	28	32	36
Agitação (rpm)	70	115	160	205	250
Petróleo (%v/v)	0,1	1,0	2,0	3,0	4,0
Inóculo (mg/mL)	0,10	0,55	1,00	1,45	1,90

Tabela IV.4. Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0.

Ensaios	Temperatura	Agitação	Petróleo	Inóculo
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

O óleo cru utilizado nos experimentos e amostras do óleo remanescente dos ensaios que apresentaram maior porcentagem de remoção de petróleo foram submetidos a análises de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM) para melhor analisar as frações de hidrocarbonetos que a levedura *Y. lipolytica* é capaz de assimilar (descrito no item IV.15.11).

IV.9. Crescimento de *Y. lipolytica* em glicerol

Com o objetivo de verificar se *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 é capaz de crescer em meio contendo o glicerol como única fonte de carbono foi realizado experimento em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo (meio mineral) e glicerol 2% a 28ºC em incubador rotatório (shaker) a 160 rpm. A concentração inicial de células nos experimentos preliminares foi 1,0 ± 0,1 mg/mL. Esse experimento foi realizado por 120 horas com amostragem diária para medida de crescimento celular e consumo de glicerol. A tensão superficial dos meios de cultivo foi medida no ínicio e no final de cada experimento.

IV.10. Experimentos controle

Foram realizados experimentos controle para verificar a perda de óleo cru que ocorre durante os experimentos de biorremediação. Essa perda pode ocorrer devido à evaporação dos compostos voláteis e também durante a amostragem diária, pois parte do petróleo fica retido na superfície externa da ponteira, já que a amostra é retirada da fase aquosa, que é mais densa que o óleo cru.

Os experimentos controle também foram realizados em erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de meio de cultivo (água do mar) por 120 horas, porém sem a presença de microrganismos. Foram retiradas amostras diárias para a suposta medida de crescimento celular, somente para simular a perda de óleo cru durante a amostragem. O óleo remanescente foi analisado ao final das 120 horas. Foram realizados experimentos controle em todas as combinações de temperatura, agitação e concentração inicial de petróleo utilizadas nos experimentos anteriores. A Tabela IV.5 resume os experimentos realizados.

Tabela IV.5. Experimentos controle.

Ensaios	Temperatura	Agitação	Petróleo
B1	-1	-1	-1
B2	+1	-1	-1
B3	-1	+1	-1
B4	+1	+1	-1
B5	-1	-1	+1
B6	+1	-1	+1
B7	-1	+1	+1
B8	+1	+1	+1
B9	-2	0	0
B10	+2	0	0
B11	0	-2	0
B12	0	+2	0
B13	0	0	-2
B14	0	0	+2
B15	0	0	0

IV.11. Caracterização da superfície celular de *Yarrowia lipolytica*

IV.11.1. Determinação do Crescimento Celular

A hidrofobicidade de *Yarrowia lipolytica* foi determinada através do teste MATS (descrito no item IV.15.7). Com o objetivo de comparar, o mesmo teste foi realizado para as cepas *Yarrowia lipolytica* W29 e *Saccharomyces cerevisiae*.

IV.11.2. Estudo da influência de polissacarídeos e proteínas na hidrofobicidade celular

IV.11.2.1. Influência das proteínas

Para verificar a influência das proteínas na hidrofobicidade celular, o teste MATS foi também realizado com células de *Y. lipolytica* após o tratamento com a mistura de endo e exo-proteases, a pronase. As células foram submetidas ao tratamento enzimático com pronase sem nenhum tratamento prévio.

As células foram suspensas em tampão Tris-HCl 0,01 M (pH 7,0) de modo a obter uma absorvância igual a 10, a 570 nm. Adicionou-se a preparação enzimática (0,1 mg/mL de pronase) e as células foram incubadas em banho maria com agitação a 37ºC por 24 horas (TAE-HYUN *et al.*, 2000). Alíquotas foram retiradas ao longo da hidrólise enzimática para a realização do teste de hidrofobicidade.

A fim de verificar se ocorre hidrólise de proteína no procedimento citado acima, ou seja, se a enzima pronase consegue ter acesso ao seu substrato (proteínas) sem que as células passem por um tratamento prévio, foi realizada a análise de proteínas (descrito no item IV.15.9) no sobrenadante do meio reacional no início e no final da reação enzimática.

Realizou-se também microscopia eletrônica de transmissão (descrito no item IV.15.12) das células controle e das células após o tratamento com pronase para observar se a hidrólise de proteínas provoca alterações na estrutura da célula.

IV.11.2.2. Influência dos polissacarídeos

Para verificar a influência dos polissacarídeos na hidrofobicidade celular, o teste MATS foi também realizado com células de *Y. lipolytica* após o tratamento com amiloglucosidase. As células foram submetidas ao tratamento enzimático com amiloglucosidase sem nenhum tratamento prévio.

O tratamento enzimático foi realizado segundo a metodologia desenvolvida por FERREIRA *et al.* (2005). Cerca de 60 mg de células (p.s.) foram suspensas em 9 mL de tampão acetato 0,2M (pH 4,8), 0,500 mL do ácido acético 3M e 0,500 mL da preparação enzimática de amiloglicosidase comercial (0,0289 mg/mL), e então, incubadas em banho maria com agitação a 65ºC por 30 minutos. A temperatura foi reduzida a 57ºC na qual permaneceu por mais 2 horas, e posteriormente, reduzida a 37ºC por mais 22 horas. Após

cada etapa de hidrólise enzimática foram retiradas alíquotas para realização do teste de hidrofobicidade.

A fim de verificar se ocorre hidrólise de polissacarídeos no procedimento citado acima, ou seja, se a enzima amiloglucosidase consegue ter acesso aos seus substratos (polissacarídeos) sem que as células passem por um tratamento prévio, foi realizada a análise de glicose (descrito no item 4.14.2) no sobrenadante do meio reacional no início e após cada etapa da reação enzimática.

Microscopias eletrônicas de transmissão das células no início e após cada etapa do tratamento com amiloglucosidase foram realizadas para observar se a hidrólise de polissacarídeos provoca alterações na estrutura da célula.

IV.12. Estudo da influência da fonte de carbono na hidrofobicidade celular

A fim de verificar a influência da fonte de carbono na hidrofobicidade de *Y. lipolytica* realizaram-se experimentos utilizando três diferentes substratos como fonte de carbono: glicose, óleo cru e glicerol (Tabela IV.6). Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, a 28ºC em incubador rotatório (shaker) a 160 rpm por 120 horas. A concentração inicial de células foi 1,0 ± 0,1 mg/mL. Foram retiradas amostras diárias para medida de crescimento celular nos três experimentos, consumo de glicose no experimento 1 e consumo de glicerol no experimento 3. O consumo de óleo cru no experimento 2 foi analisado ao final das 120 horas. A tensão superficial dos meios de cultivo foi medida no ínicio e no final de cada experimento.

Ao final de cada experimento, a hidrofobicidade celular também foi avaliada. Além disso, as células foram expostas às hidrólises enzimáticas descritas no item IV.11.2 para melhor avaliar o envolvimento dos principais componentes da parede celular na hidrofobicidade.

Tabela IV.6. Experimentos para avaliar a influência da fonte de carbono na hidrofobicidade celular.

Experimento	Fonte de carbono	Meio de cultivo
1	Glicose (2%v/v)	YPD
2	Óleo Cru (1%v/v)	Água do Mar
3	Glicerol (20g/L)	Meio Mineral

IV.13. Esterilização dos meios de cultura

Todos os meios, assim como os instrumentos utilizados no manuseio do meio de cultivo, foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 15 minutos, com exceção do petróleo, que era adicionado a água do mar autoclavada em ambiente estéril (capela de fluxo laminar).

IV.14. Amostragem

Em todos os experimentos foram retiradas alíquotas, por dia de fermentação (a cada 24 h). O procedimento consistia em retirar três amostras do meio fermentado. As três amostras eram diluídas para leitura em espectrofotômetro e obtenção da concentração celular. Nos experimentos com óleo cru, uma alíquota de 1 mL também era retirada para quantificação do crescimento celular através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) no final de cada experimento (120 h). Em seguida, cerca de 30 mL da fase aquosa era separada e centrigugada, sendo o sobrenadante utilizado para medir tensão superficial e as células utilizadas para os estudos de hidrofobicidade. A fase aquosa utilizada para medir a tensão superficial era, então, novamente adicionada ao meio e era realizada a etapa de extração da fase orgânica com clorofórmio. A fase orgânica era utilizada para medir a concentração de óleo cru.

Nos experimentos com glicose ou glicerol, eram retiradas também amostras diárias de 1 mL. Essas amostras eram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para dosagem de glicose ou glicerol.

IV.15. Métodos Analíticos

IV.15.1. Quantificação do Crescimento Celular

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *HACH DR/4000* a 570 nm e esses valores foram convertidos para mg p.s. cél/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco, que é apresentada na Figura V.7. A curva peso seco *versus* absorvância é obtida usando-se uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) NaCl). Desta suspensão, retira-se uma amostra (20 mL), que é filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 μm), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas e, então, o valor de absorvância para cada concentração é obtida em espectrofotômetro a 570 nm.

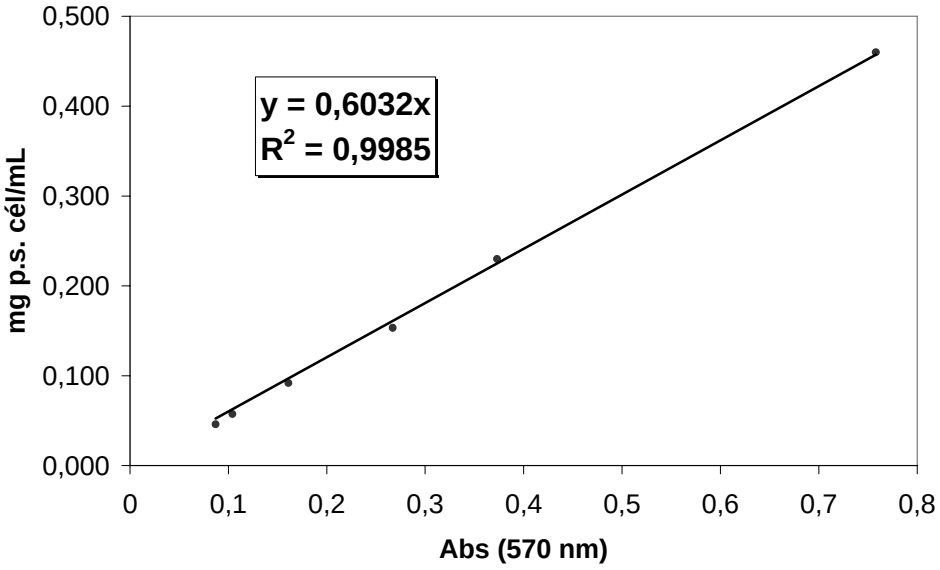

Figura IV.2. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *HACH DR/4000*.

IV.15.2. Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose presente do meio de cultivo foi medida pelo método da glicose oxidase utilizando um *kit* enzimático para análise colorimétrica de glicose (*HUMAN GmbH - Germany*).

Nesse método, a absorvância da reação enzimática é medida em espectrofotômetro a 500 nm, contra o branco de reação, que é composto apenas pelo Reagente Enzimático e água. Tomam-se alíquotas de 15 µL de amostra e completa-se com 1500 µL de Reagente Enzimático. Após a homogeneização, incuba-se por 10 min a 37°C, sendo a absorvância da amostra e do padrão mensuradas em no máximo 60 minutos.

O padrão de glicose pertencente ao kit enzimático possui uma concentração de 100 $mg.dL^{-1}$ e o Reagente Enzimático contém: tampão fosfato (pH 7,5) 100 $mmol.L^{-1}$; 4-aminofenazona 0,25 $mmol.L^{-1}$; Fenol 0,75 $mmol.L^{-1}$; Glicose oxidase 15000 $U.L^{-1}$; Peroxidase 1500 $U.L^{-1}$; Mutarotase 2000 $U.L^{-1}$.

O cálculo de concentração de glicose é realizado através da Eq. (4.1):

$$[Glicose] = 100 \times \left(\frac{A_a}{A_p} \right) \tag{4.2}$$

onde:

A_a = Absorvância da amostra;

A_p = Absorvância do padrão;

[*glicose*] = concentração de glicose na amostra ($mg.dL^{-1}$).

IV.15.3. Determinação da concentração de óleo cru

A concentração de óleo cru ao final de cada experimento foi quantificada através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *HACH DR/4000* a 240 nm e esses valores foram convertidos para % v/v utilizando-se a curva padrão.

Primeiramente, o óleo cru (petróleo Marlin) foi diluído em clorofórmio e, então, realizou-se uma varredura na região do UV-VIS contra o branco (clorofórmio). O espectro de absorção na região do UV-VIS (Figura IV.8) mostra que o óleo utilizado apresenta uma

forte absorção por volta de 240 nm. Sendo assim, uma curva padrão foi construída a 240 nm utilizando soluções de óleo cru em clorofórmio entre 0,0005 e 0,004% v/v (Figura IV.9).

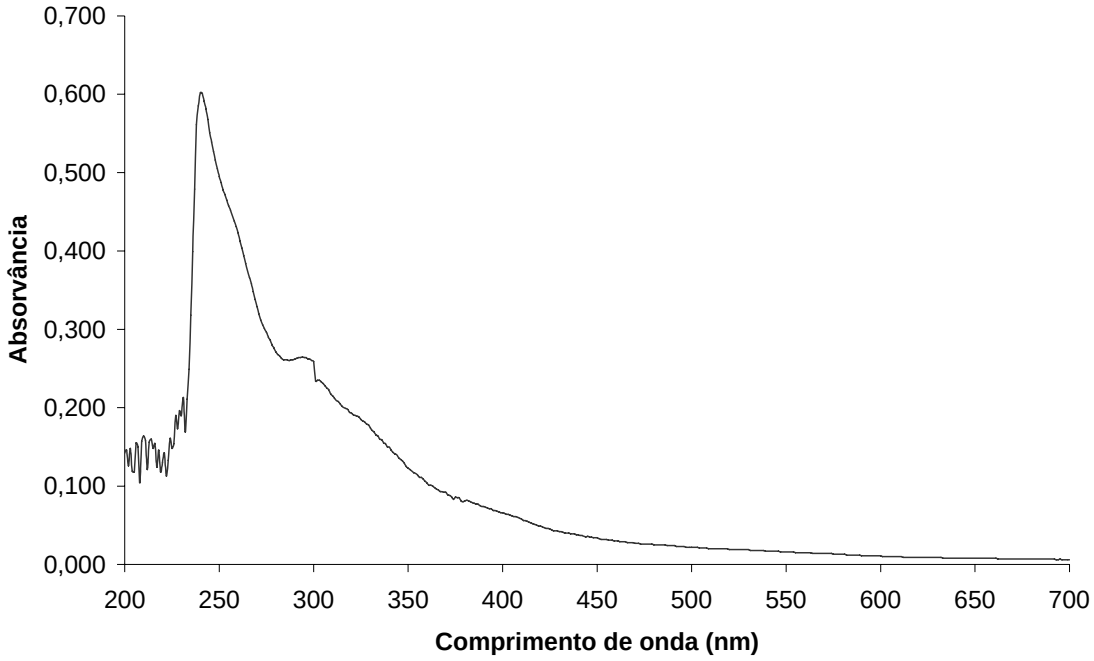

Figura IV.3. Espectro de absorção do óleo cru em clorofórmio na região UV-VIS.

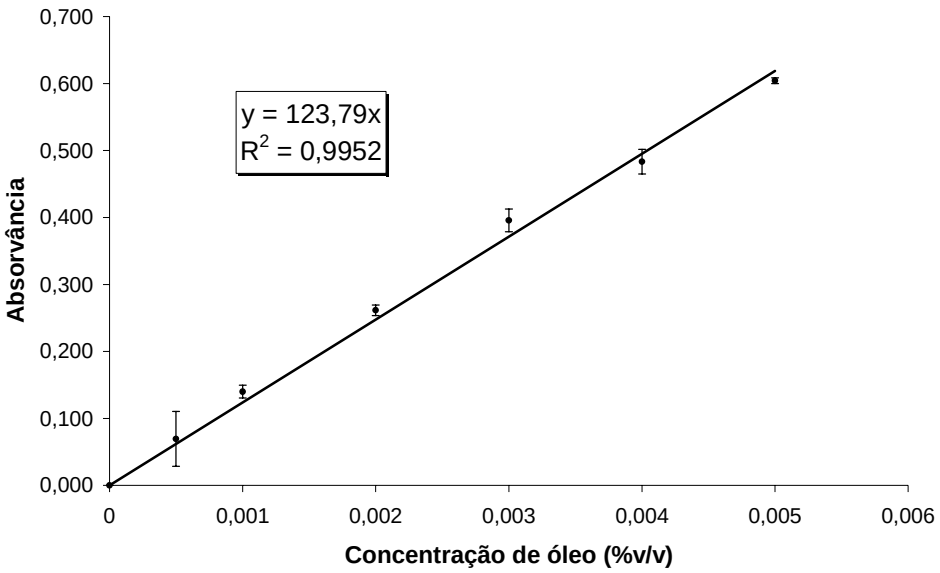

Figura IV.4. Curva padrão para quantificação da concentração de óleo cru através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *HACH DR/4000*.

Para analisar a porcentagem de óleo cru removida ao final dos experimentos, todo o volume do erlenmeyer (50 mL) era transferido para um funil de separação, no qual se adicionava 25 mL de clorofórmio para a extração da fase orgânica (petróleo). O tempo de extração era de aproximadamente 5 minutos e, em seguida, diluía-se a amostra e realizava-se a leitura em espectrofotômetro a 240 nm.

É importante ressaltar que este método de quantificação de óleo cru não é uma maneira correta de quantificar o óleo total, pois somente alguns aromáticos presentes no óleo cru absorvem a 240 nm. Essa medida apenas apresenta um valor aproximado do nível de remoção.

IV.15.4. Determinação da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

O modo usual de realizar uma contagem de células viáveis (célula capaz de se multiplicar e dar origem a uma célula-filha) consiste em determinar o número de células capazes de formar colônias em um meio de cultura sólido com composição adequada ao crescimento do microrganismo. Assume-se que cada colônia é originada a partir de uma única célula viável, o que nem sempre é verdade, pois duas ou mais células que formem um

agregado, darão origem a uma única colônia. Por isso, os resultados são normalmente expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).

Após diluição conveniente da suspensão celular em solução salina (0,9% (p/v) de NaCl) estéril, espalhou-se um volume conhecido (0,1 ml) de cada suspensão diluída sobre meio de cultura YPD sólido depositado em placa de Petri para a multiplicação celular da levedura. Pretende-se que as células fiquem distanciadas de modo que, após várias divisões celulares, originem colônias visíveis a olho nu, o que se verificou após 48 horas de incubação a 28ºC. O grau de diluição da suspensão celular foi escolhido de modo a que o número de colônias isoladas em cada placa não fosse inferior a 20 ou superior a 300 colônias.

IV.15.5. Determinação do pH do meio de cultivo

O pH do meio de cultivo livre de células foi determinado utilizando-se um pHmetro de bancada na temperatura ambiente (27°C).

IV.15.6. Determinação da concentração de glicerol

A concentração de glicerol presente no meio de cultivo foi quantificado por método enzimático-colorimétrico para quantificação de triglicerídeos (*Kit* LABORLAB para triglicerídeos).

Nesse método, a absorvância da reação enzimática é medida em espectrofotômetro a 505 nm, contra o branco de reação, que é composto apenas pelo Reativo de Trabalho e água. A quantificação foi realizada a partir de 10 μL da amostra e 1000 μL do reativo de trabalho. Após homogeneização, procedeu-se a incubação em banho maria a 37ºC por 15 minutos, sendo a absorvância da amostra e do padrão mensuradas em no máximo 60 minutos.

O padrão de glicerol pertencente ao kit enzimático possui uma concentração de 2,26 $mmol.L^{-1}$ e o Reativo de Trabalho contém: reativo enzimático (lipase 5000 $U.L^{-1}$; glicerol quinase 200 $U.L^{-1}$; glicerol fosfato oxidase 1500 $U.L^{-1}$; peroxidase 900 $U.L^{-1}$; ATP 2 $mmol.L^{-1}$; 3-5 HDCBS 2 $mmol.L^{-1}$; 4-aminofenazona 1 $mmol.L^{-1}$) e 30 mL de reativo de tampão (50 $mmol.L^{-1}$ tris, pH 7,6).

O cálculo da concentração de glicerol é realizado através da Eq.(4.2):

$$[Glicerol] = 2{,}26 \times \left(\frac{A_a}{A_p} \right) \qquad (4.2)$$

onde:

A_a = Absorvância da amostra;

A_p = Absorvância do padrão;

[*glicerol*] = concentração de glicerol na amostra (mmol.L^{-1})

IV.15.7. Teste MATS (microbial adhesion to solvents – adesão microbiana à solventes).

Este teste determina as propriedades doadoras/aceptoras de elétrons (ácido/base de Lewis) da parede celular dos microrganismos (BELLON-FONTAINE *et al.*, 1996). A técnica é baseada na afinidade celular microbiana a solventes monopolares e apolares. Os solventes monopolares podem ser ácidos (aceptor de elétrons) ou básicos (doador de elétrons), mas os dois solventes devem ter componentes similares de tensão superficial *Lifshitz-van der Waals*. Os pares de solventes normalmente utilizados são:

• Clorofórmio, um solvente ácido que não apresenta caráter básico quando puro (aceptor de elétrons) e hexadecano;

• Acetato de etila, um solvente fortemente básico (doador de elétrons) e decano.

As propriedades de tensão superficial dessas substâncias estão apresentadas na Tabela IV.7.

A hidrofobicidade é avaliada pela adesão de células ao hexadecano; o caráter doador de elétrons é dado pelo % de adesão de células ao clorofórmio menos o % de adesão de células ao hexadecano e o caráter aceptor de elétrons é dado pelo % de adesão de células ao acetato de etila menos o % de adesão de células ao decano. Como neste trabalho o interesse é analisar apenas a hidrofobicidade celular, foi avaliada somente a % de adesão das células ao hexadecano.

As células foram suspensas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) de modo que a medida de absorvância a 570 nm (A_0) fosse de aproximadamente 0,7. Essa suspensão celular (3,0 mL) foi adicionada a um tubo de vidro contendo 0,5 mL de solvente e, em seguida, o tubo agitado em vortex por 50 segundos. Após 10 minutos, determinou-se a absorvância da fase aquosa a 570 nm (A). Os resultados são dados em percentual de células aderidas, segundo a Eq. (4.3):

$$\%Adesão = \left(1 - \left(A/A_o\right)\right) \times 100 \tag{4.3}$$

onde:

A = Absorvância inicial (antes da agitação);

A_0 = Absorvância final (após a agitação).

Tabela IV.7. Propriedades de tensão superficial dos solventes utilizados no teste MATS (BELLON-FONTAINE *et al.*, 1996).

Líquido	Fórmula	γ^{LW} [mJ.m^{-2}]	γ^{+} [mJ.m^{-2}]	γ^{-} [mJ.m^{-2}]
Clorofórmio	$CHCl_3$	27,2	3,8	0
Hexadecano	$C_{16}H_{34}$	27,7	0	0
Acetato de Etila	$C_4H_{10}O$	23,9	0	19,4
Decano	$C_{10}H_{22}$	23,9	0	0

IV.15.8. Determinação da produção de biosurfactante

O método utilizado para verificar a produção de biossurfactante foi a medição da tensão superficial.

A determinação da tensão superficial foi realizada utilizando o tensiômetro *K100 Krüss* (Figura IV.5), segundo o método da placa e anel *De Nöuy*. Para cada amostra analisada foram necessários 30 mL de sobrenadante livre de células, mantidos a 30°C. O equipamento foi previamente calibrado com água destilada na mesma temperatura.

As análises foram realizadas no laboratório de Sistemas Particulados, sob responsabilidade do professor Márcio Nele de Souza.

Figura IV.5. Tensiômetro *K100 Krüss*.

IV.15.9. Determinação do teor de proteína

Para determinação do teor de proteína presente no sobrenadante das reações enzimáticas, utilizou-se o método sugerido por Lowry (1951) que, assim como o método de Bradford (1976), é uma técnica bastante conhecida e utilizada para quantificação de proteína.

Para realizar a determinação de proteína, inicialmente, foi preparada uma mistura (Reagente A) adicionando 1 mL de $CuSO_4$ 1% (v/v) a 1 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio 2% (p/v) e completando o volume reacional até 100 mL com solução de $NaCO_3$ 2% em NaOH (0,1N).

Posteriormente, em câmara escura, 1 mL da amostra (ou água destilada no caso do branco) foram misturados a 4 mL do Reagente A. Após 10 minutos em repouso a temperatura ambiente, ainda em câmara escura, adicionou-se 0,4 mL de solução de Folin-Ciocalteau, a qual é previamente diluída 1:2 em água destilada. Depois de 30 minutos à temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 660 nm.

Para obtenção da curva padrão de proteína, correlacionou-se os valores de absorvância obtidos a partir da leitura de soluções com concentrações conhecidas de proteína padrão (soro albumina bovina - BSA), variando-se a concentração de BSA entre

0,01 e 0,10 mg de proteína/mL. A curva padrão de proteína está representada na Figura IV.6.

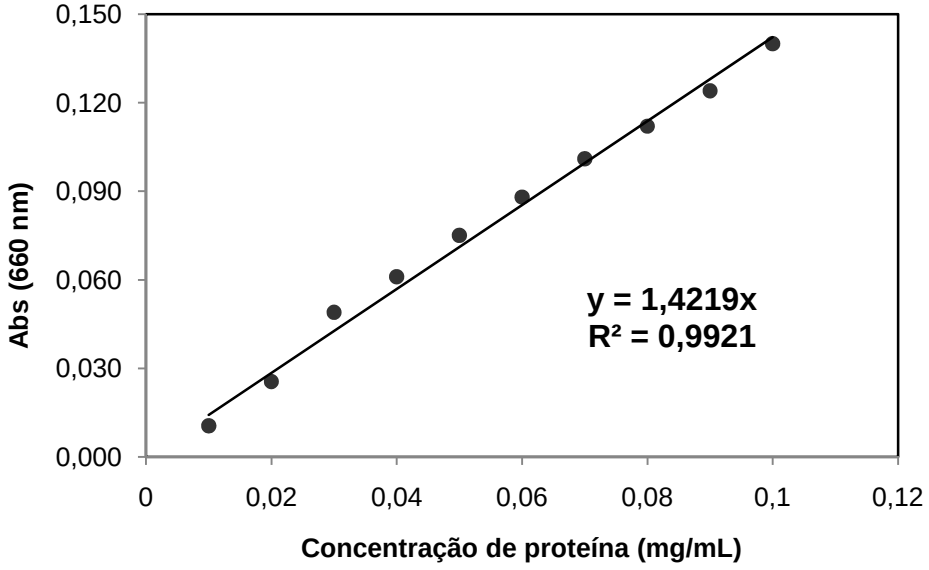

Figura IV.6. Curva padrão para quantificação de proteína.

IV.15.10. Cromatografia gasosa

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas no Laboratório LADETEC, no Instituto de Química da UFRJ.

O óleo cru utilizado e o óleo cru remanescente do ensaio de biodegradação do experimento preliminar 1 (onde as células cresceram em água do mar contendo apenas óleo cru 1%v/v) foram analisados por cromatografia gasosa de alta resolução utilizando detector por ionização em chama (CG/DIC). O equipamento utilizado foi *Hewlett-Packard 6890 Plus* equipado com amostrador automático *Agilent 7673* , com uma coluna capilar de sílica fundida recoberta com DB-5 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano; J & W; 30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 m espessura de fase). A programação de temperatura do forno foi de 60ºC a 320ºC, 6ºC/min e mantido em isoterma a 320ºC por 20 minutos. A temperatura do injetor foi de 290ºC e do detector foi de 340ºC. Foi utilizado hidrogênio como gás de arraste e injeção sem divisão de fluxo por 0,75 segundo. As amostras injetadas estavam diluídas em clorofórmio.

IV.15.11. Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório LADETEC, no Instituto de Química da UFRJ.

O óleo cru utilizado e o óleo cru remanescente em alguns ensaios do planejamento fatorial foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), utilizando-se o instrumento *Hewlett-Packard 6890N* acoplado a um detector seletivo de massas *Agilent 5973* (Figura IV.7) , com uma coluna capilar de sílica fundida recoberta com DB-5 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano; J & W; 30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μm de espessura de fase).

As condições cromatográficas utilizadas nas análises de hidrocarbonetos das amostras de óleos foram: temperatura 40°C (com isoterma iguais as utilizadas no item IV.15.10, ou seja, de 60ºC a 320ºC, 6ºC/min e mantido em isoterma a 320ºC por 20 minutos. A introdução da amostra foi realizada através de injeção automática de 1μL da amostra e do padrão sem divisão de fluxo (*splitless*). Utilizou-se ionização por impacto de elétrons a 70 eV, utilizando hélio como gás carreador a uma pressão constante de 10 psi e a uma temperatura do injetor de 290°C.

As amostras foram analisadas por CG-EM através do modo varredura linear (*Full-Scan*). Para a varredura linear, utilizou-se uma faixa de detecção de 40 a 600 m/z.

Figura IV.7. Cromatógrafo gasoso *Hewlett-Packard 6890N* acoplado a um espectrômetro de massas *Agilent 5973.*

IV.15.12. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram realizadas no Laboratório de Biomineralização do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ.

As células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 por uma hora. Depois, realizaram-se lavagens sucessivas em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. As células foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 por mais uma hora e novamente lavagens sucessivas foram conduzidas em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2.

Em seguida, as células foram desidratadas em uma série de soluções de acetona com concentrações crescentes. Foram utilizadas soluções com 10, 35, 50, 70, 90 e 100% de acetona. As células permaneceram 20 minutos em cada solução.

Após a desidratação, as células foram incluídas em Epon (Epoxy), que é uma resina plástica de polimerização a quente. Foi utilizada uma série de soluções de Epon/acetona com concentrações crescentes de Epon. As células permaneceram por 12 horas em cada solução ficando sempre em local refrigerado (geladeira). Foram utilizadas soluções de

Epon/acetona nas proporções 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, respectivamente. Depois, adicionou-se Epon puro colocando-as na geladeira por mais 24 horas. O pellet foi removido, colocado em uma placa com Epon e incubado em estufa onde permaneceu por 24 horas para polimerização do Epon.

As amostras foram cortadas em um ultramicrótomo *Reichert* e fixadas em grades de cobre. Posteriormente, as mesmas foram observadas em um microscópio eletrônico modelo *Jeol 1200 EX* operando a 80 KV (Figura IV.8)

Figura IV.8. Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo *Joel 1200EX*.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. Experimentos preliminares

Na Figura V.1 podemos observar o perfil de crescimento celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 no Experimento 1, onde a única fonte de carbono presente é o petróleo. A concentração celular na fase aquosa do meio de cultivo apresentou pequena oscilação durante o experimento, permanecendo praticamente constante. Isso se deve ao fato das células terem migrado para fase orgânica (petróleo). Sendo assim, o crescimento celular foi também medido pelo método de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) a fim de verificar se as células estavam viáveis visto que aparentemente não apresentavam crescimento celular.

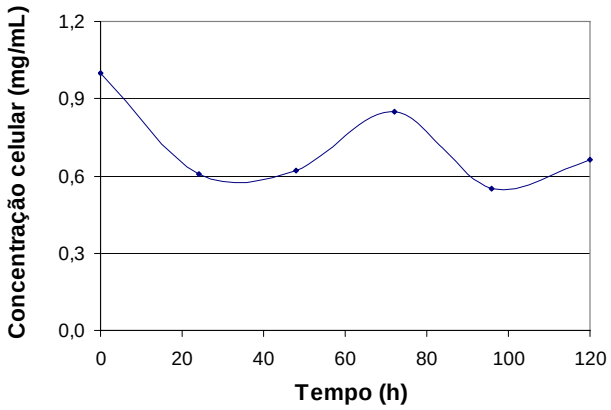

Figura V.1. Perfil de crescimento de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em água do mar contendo 1%v/v de petróleo.

A contagem de Unidades Formadoras de Colônia foi realizada no ínicio e no final do experimento. Os resultados da Tabela V.1 mostram a existência de células viáveis ao final do experimento, mostrando que a levedura *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 é capaz de viver em meio contendo óleo cru como única fonte de carbono. Porém, esse método foi apenas utilizado para verificar a viabilidade das células e não para quantificar o

crescimento celular visto que a amostra para o uso de tal metodologia, assim como na quantificação através do método do peso seco, é retirada da fase aquosa. Sendo assim, ocorre uma subestimação do crescimento celular já que as células migram para fase orgânica.

Tabela V.1. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia no início e no final do crescimento de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em água do mar contendo 1%v/v de óleo cru.

UFC/mL	
Inicial	**Final**
$3,7 \times 10^{12}$	$1,32 \times 10^{14}$

A Figura V.2 (A) mostra o perfil de crescimento celular e consumo de glicose de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em água do mar com glicose 2% e a Figura V.2 (B) mostra o perfil desta mesma cepa crescendo em água do mar contendo glicose 2% e petróleo 1%. O crescimento celular foi um pouco maior no meio contendo duas fontes de carbono, glicose e petróleo, e consequentemente, o consumo de glicose, um dos substratos, também foi maior neste meio de cultivo.

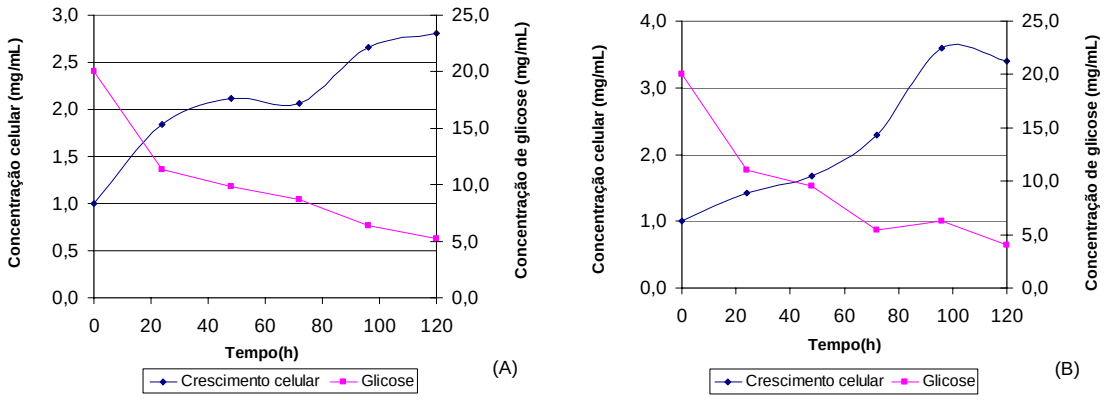

Figura V.2. Perfil de crescimento celular e consumo de glicose de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em (A) água do mar com glicose 2% e em (B) água do mar com glicose 2% e petróleo 1%v/v.

A tensão superficial dos meios medida no início e no final de cada experimento encontra-se na Tabela V.2. Podemos verificar que apesar dos perfis de crescimento celular

serem bem parecidos nos experimentos 2 e 3 (Figura V.2), a cepa apresentou maior produção de biossurfactante no experimento 3, sendo capaz de reduzir em aproximadamente 30 mN/m a tensão do meio de cultivo; enquanto que nos outros experimentos essa redução foi de apenas cerca de 7 mN/m.

A pequena redução na tensão superficial no experimento 2 quando comparado com o experimento 3 mostra que a produção de biossurfactante não depende somente do crescimento celular mas também da fonte de carbono presente no meio de cultivo. *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 foi capaz de produzir elevada quantidade de biossurfactante quando crescida em meio contendo substrato hidrofóbico (petróleo), porém em meio contendo somente substrato hidrofílico (glicose) esta mesma cepa não produziu quantidades significantes de biossurfactante. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por PAREILLEUX (1979), que isolou compostos tenso-ativos crescendo a levedura *Candida lipolytica* em meio contendo *n*-alcanos como fonte de carbono, mas quando foi cultivada em meio contendo glicose não produziu nenhum bioemulsionante. Em um estudo similar, ZINJARDE e PANT (2002) mostraram que a biossíntese de surfactante por *Y. lipolytica* NCIM 3589 utilizando como fonte de carbono substratos solúveis (glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool) não é viabilizada. Entretanto, em meio contendo óleo cru e alcanos (C_{10} – C_{18}) detectou-se a produção de bioemulsificante.

Tabela V.2. Tensão superficial dos meios de cultivo no início e no final dos experimentos preliminares.

	Tensão superficial (mN/m)	
	Inicial	**Final**
Experimento 1	66,712 ± 0,046	60,106 ± 0,087
Experimento 2	68,241 ± 0,087	61,059 ± 0,122
Experimento 3	68,241 ± 0,087	38,296 ± 0,185

Contudo é possível observar no experimento 1, onde a única fonte de carbono presente é o petróleo, uma baixa redução da tensão superficial do meio de cultivo. Essa baixa redução pode estar ligada ao crescimento celular que foi limitado, seja devido à falta de nutrientes ou devido à baixa disponibilidade da fonte de carbono visto que nem todos os

compostos presentes no óleo cru são assimiláveis pela levedura. Além disso, o petróleo é um substrato hidrofóbico, necessitando de mecanismos especiais para sua absorção.

Apesar da produção de biossurfactantes ocorrer na presença de fontes de carbonos solúveis em água, como os açúcares, vários estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados (HOMMEL et al., 1994). Muitos trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel em água e um carboidrato, como constituintes do meio de cultura. SARUBBO *et al.* (2007) otimizaram as condições de produção do biossurfactante por *C. lipolytica* em meio contendo um substrato hidrofóbico, óleo de canola (100 g/L), e um substrato hidrofílico, glicose (100 g/L). O biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 71 mN/m para valores em torno de 30 mN/m.

FONTES (2008) otimizou a produção de bioemulsionantes por *Y. lipolytica*, a partir do trabalho de AMARAL et al. (2006), obtendo-se o meio contendo glicose e glicerol como fonte de carbono e sulfato de amônia como fonte de nitrogênio.

A Tabela V.3 mostra a porcentagem de remoção de petróleo nos experimentos 1 e 3. Como no experimento 1, o crescimento celular foi menor do que no experimento 3, a porcentagem de remoção de petróleo também foi inferior.

Tabela V.3. Porcentagem de remoção de petróleo analisado por espectrofotometria nos experimentos preliminares 1 e 3.

	% Remoção
Experimento 1	40
Experimento 3	60

O petróleo utilizado neste trabalho apresenta aproximadamente 19°API, sendo considerado um petróleo pesado. Óleos pesados não perdem mais do que 10% de seu volume após o derrame (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003). Considerando que cerca de 10% do petróleo sofreu evaporação e outros 10% tenham sido perdidos durante a amostragem diária já que o óleo é menos denso que a fase aquosa ficando em cima como mostra a Figura V.3 (A), a remoção de óleo cru no experimento 1 foi de cerca de 20%. Já no experimento 3, a perda durante a amostragem deve ter sido menor visto que o alta

produção de biossurfactante emulsionou praticamente todo o óleo como mostra a Figura V.3 (C). Sendo assim, a remoção de petróleo no experimento 3 foi de cerca de 45%.

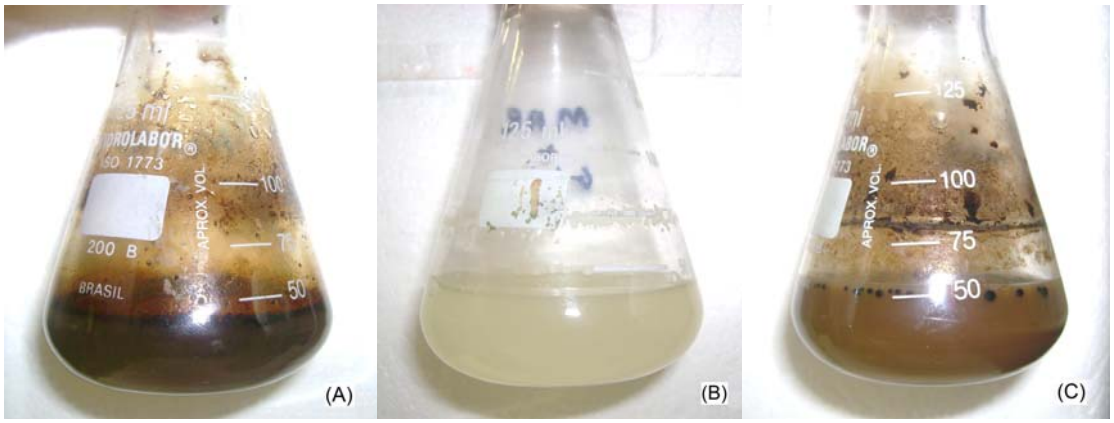

Figura V.3. Experimentos preliminares (A) 1, (B) 2 e (C) 3 após 120 horas.

A fim de confirmar se *Y. lipolytica* é capaz de consumir alguns hidrocarbonetos presentes no petróleo, o óleo cru utilizado neste trabalho e o óleo remanescente no experimento 1 foram submetidos a análises de cromatografia gasosa utilizando detector por ionização em chama (CG/DIC) (descrito no item V.14.9). Realizou-se também um ensaio controle para verificar se os compostos removidos do meio eram assimilados pelo microorganismo ou simplesmente sofriam evaporação. O ensaio controle consistiu em um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de água do mar com petróleo 1% a 28 C e 160 rpm por 120 horas, sem a presença de microorganismo. O óleo remanescente também foi extraído com clorofórmio e analisado por CG/DIC. Os cromatogramas encontram-se na Figura V.4.

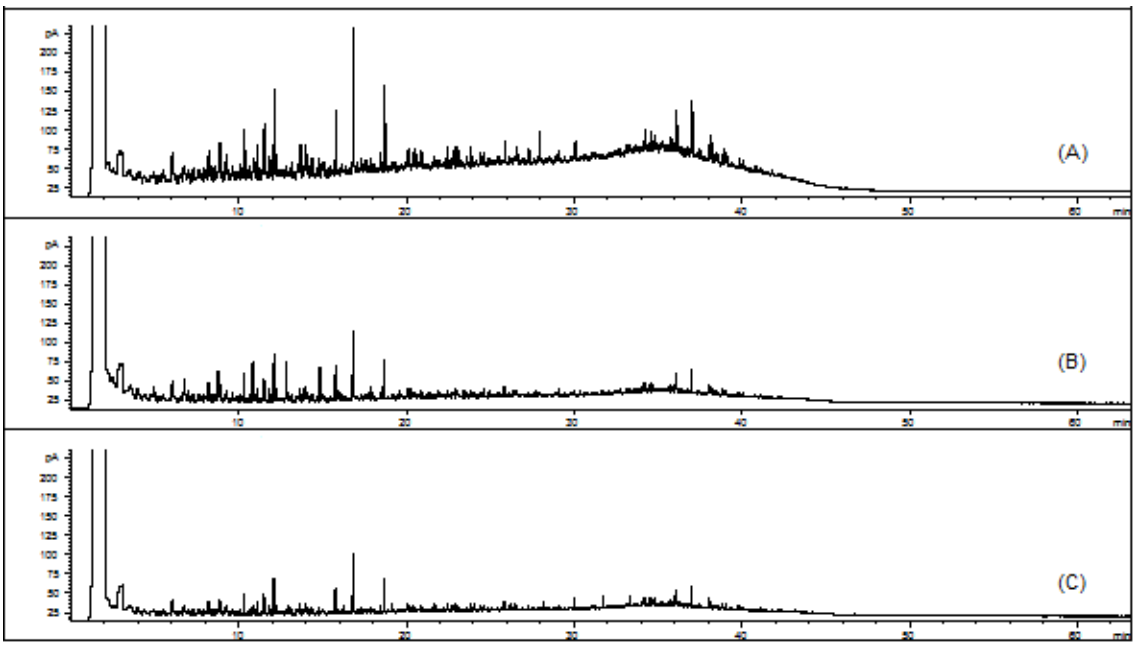

Figura V.4. Cromatograma de CG/DIC do (A) óleo cru (Marlin) (B) óleo remanescente no ensaio controle e (C) óleo remanescente no experimento 1.

Comparando o cromatograma do óleo cru utilizado neste trabalho (Figura V.4 (A)) com o cromatograma do óleo remanescente no ensaio controle (Figura V.4 (B)) podemos verificar que a maior parte dos compostos permanecem no meio de cultivo pois não sofrem evaporação, havendo somente diferença de tamanho nos picos. Porém essa diferença de intensidade dos picos está relacionada com a concentração da amostra visto que a amostra contendo o óleo cru (Figura V.4 (A)) encontrava-se mais concentrada que as outras duas.

Já comparando o cromatograma do óleo remanescente no ensaio controle (Figura V.4 (B)) com o cromatograma do óleo remanescente no experimento 1 (Figura V.4 (C)), que se encontravam na mesma concentração, podemos verificar que muitos picos desaparecem. Esses resultados confirmam que a levedura em questão é capaz de assimilar alguns hidrocarbonetos presentes no óleo cru, principalmente os hidrocarbonetos de menor peso molecular, ou seja, aqueles que apresentam tempo de retenção de até 15 minutos.

V.2. Estudo das variáveis que influenciam no processo de biodegradação

Para estudar os parâmetros que influenciam na biodegradação de óleo cru por *Y. lipolytica* e otimizar as condições de temperatura e agitação do processo de biorremediação foi utilizada a estratégia do delineamento composto central rotacional (DCCR) para 4 variáveis. O planejamento experimental consistiu em DCCR 2^4, mais 8 pontos axiais e 3 repetições no pontos centrais, totalizando 27 ensaios.

Os resultados do planejamento, tendo como variáveis dependentes temperatura, agitação, concentração inicial de petróleo e concentração do inóculo e, como variáveis respostas, a remoção de petróleo e a redução da tensão superficial após 120 horas de experimento estão apresentados na Tabela V.4.

Podemos notar que após 120 horas de experimento, nas condições utilizadas, a porcentagem de remoção de petróleo variou de 12 a 90% e a variação da tensão superficial variou de 4,35 a 23,23 mN/m. Observando os resultados dos pontos centrais (ensaios 25, 26 e 27) verifica-se que estes apresentam valores bem próximos, mostrando assim a reprodutibilidade do bioprocesso. É válido ressaltar também que a diferença entre os pontos de máximo e mínimo das variáveis respostas (78% e 18,88 mN/m) é bem maior que a variação desses valores para as condições do ponto central (4% e 2,06 mN/m), comprovando que as variações observadas nos valores de remoção e tensão superficial são decorrentes da modificação das condições de biorremediação.

Tabela V.4. Ensaios do planejamento fatorial completo 2^4 e resultados de remoção do óleo e produção de biosurfactante.

Exp.	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Petróleo (%v/v)	Inóculo (mg/mL)	% Remoção	Tensão Superficial (mN/m)
1	24	115	1,0	0,55	37	12,31
2	32	115	1,0	0,55	41	13,08
3	24	205	1,0	0,55	42	15,12
4	32	205	1,0	0,55	45	16,57
5	24	115	3,0	0,55	16	17,88
6	32	115	3,0	0,55	19	18,56
7	24	205	3,0	0,55	20	21,06
8	32	205	3,0	0,55	23	22,74
9	24	115	1,0	1,45	62	14,53
10	32	115	1,0	1,45	65	15,89
11	24	205	1,0	1,45	65	17,67
12	32	205	1,0	1,45	69	18,35
13	24	115	3,0	1,45	32	18,54
14	32	115	3,0	1,45	35	19,97
15	24	205	3,0	1,45	35	22,01
16	32	205	3,0	1,45	38	23,23
17	20	160	2,0	1,00	21	12,39
18	36	160	2,0	1,00	31	19,93
19	28	70	2,0	1,00	35	11,98
20	28	250	2,0	1,00	52	19,93
21	28	160	0,1	1,00	90	4,35
22	28	160	4,0	1,00	22	18,35
23	28	160	2,0	0,10	12	9,59
24	28	160	2,0	1,90	71	19,47
25	28	160	2,0	1,00	41	16,61
26	28	160	2,0	1,00	37	15,95
27	28	160	2,0	1,00	39	14,55

A maior porcentagem de remoção (90%) foi obtida no ensaio 21, quando se realizou o experimento na menor concentração de petróleo seguida do ensaio 24 (71%), quando se realizou o ensaio na maior concentração de inóculo. Consequentemente, os ensaios que foram realizados utilizando o menor nível da concentração de petróleo e o maior nível da concentração de inóculo (9, 10, 11 e 12), resultaram numa maior porcentagem de remoção do óleo cru.

A Figura V.5 apresenta o diagrama de Pareto gerado pelo planejamento experimental realizado para remoção de petróleo, calculados considerando diferentes tipos de interações entre as variáveis. Analisando-se o diagrama, podemos verificar que variável concentração inicial de petróleo (3) apresentou o maior efeito significativo sobre a variável resposta (α = 95%), seguido pela concentração de inóculo (4), sendo o aumento da concentração inicial de petróleo um efeito negativo sobre a remoção e o aumento da concentração de inóculo um efeito positivo sobre a mesma. As outras variáveis, agitação (2) e temperatura (1), também apresentaram um efeito significativo positivo sobre a remoção. Além disso, dois outros parâmetros se mostraram estatisticamente significativos, os termos quadráticos da concentração inicial de petróleo e da temperatura, sendo que o primeiro apresentou um efeito positivo e o segundo um efeito negativo. Os termos quadráticos da agitação e da concentração de inóculo e as interações concentração de petróleo/concentração de inóculo, agitação/concentração de inóculo, agitação/concentração de petróleo, temperatura/concentração de petróleo, temperatura/concentração de inóculo e temperatura/agitação não apresentaram efeitos significativos sobre a remoção de petróleo (α = 95%). Na Tabela V.5 estão listados os valores dos efeitos de cada variável, bem como o desvio padrão, o valor de t e o nível de significância p.

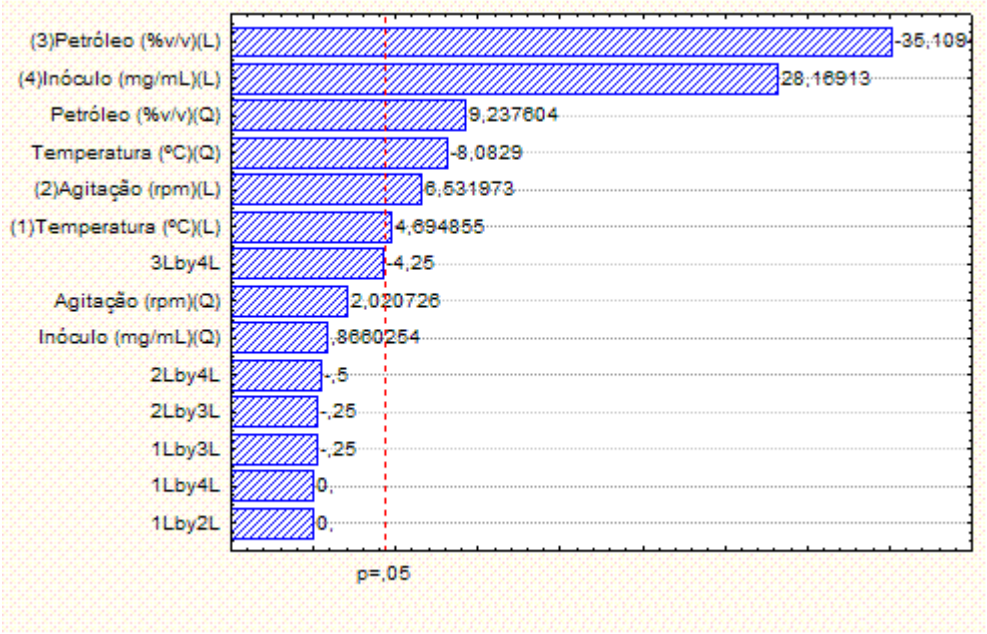

Figura V.5. Diagrama de Pareto gerado pelo Statistica 7.0 para analisar as variáveis que influenciam na biodegradação.

Tabela V.5. Efeitos das variáveis no planejamento fatorial completo para remoção de óleo cru por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682.

Variáveis	Efeito	Desvio	t(2)	P
Média	39,0	1,15	33,78	0,0009
Temperatura (L)	3,8	0,81	4,69	0,0425
Temperatura (Q)	-7,0	0,87	-8,08	0,0150
Agitação (L)	5,3	0,82	6,53	0,0226
Agitação (Q)	1,8	0,87	2,02	0,1807
Petróleo (L)	-28,7	0,82	-35,10	0,0008
Petróleo (Q)	8,0	0,87	9,23	0,0115
Inóculo (L)	23,0	0,82	28,17	0,0012
Inóculo (Q)	0,8	0,87	0,87	0,4777
Temperatura/Agitação	0,0	1,00	0,00	1,0000
Temperatura/Petróleo	-0,3	1,00	-0,25	0,8259
Temperatura/Inóculo	0,0	1,00	0,00	1,0000
Agitação/Petróleo	-2,5	1,00	-0,25	0,8259
Agitação/Inóculo	-0,5	1,00	-0,50	0,6667
Petróleo/Inóculo	-4,3	1,00	-4,25	0,0511

Alguns trabalhos na literatura têm reportado o efeito negativo da concentração inicial de petróleo sobre a porcentagem de remoção de óleo cru. DEL' ARCO e FRANÇA (2001) utilizaram uma cultura mista obtida de um *landfarming* associada a microrganismos nativos na biorremediação de sedimentos arenosos contaminados com óleo Árabe leve e verificaram após 29 dias diferentes índices de remoção (33,7; 32,9 e 28,9% de óleos e graxas; 88,5; 35,3 e 13,0% de *n*-alcanos C_{14}-C_{26}; 100; 61,3 e 59,4% de pristano) para diferentes concentrações de petróleo iniciais (14g/Kg, 12g/Kg e 28g/kg, respectivamente), corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

Trabalhos na literatura também reportam o efeito positivo causado pela concentração de inóculo, agitação e temperatura. O efeito positivo da concentração de inóculo já era esperado, pois quanto maior a população microbiana maior será a taxa de biodegradação do petróleo. Principalmente nas condições em que foram realizados os experimentos, sem adição de nutrientes para o crescimento microbiano, sendo assim, o inóculo tem um papel mais importante ainda.

Estudos reportam tanto a degradação de alcanos como a de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) sob condições anóxicas, porém a taxa de degradação

anaeróbia de hidrocarbonetos é geralmente menor que as equivalentes taxas de degradação aeróbia (HEAD e SWANNELL, 1999). GRISHCHENKOV *et al*. (2000) isolaram cepas de bactérias de solo contaminado com petróleo e verificaram que sob condições aeróbias as cepas degradaram 20-25% do petróleo total em 10 dias e sob condições anaeróbias as cepas levaram 50 dias para degradar 15-18% do petróleo total. Além disso, a cepa utilizada neste trabalho, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, é estritamente aeróbia, logo, o efeito positivo da variável agitação também já era esperado visto que uma maior agitação do sistema promove um aumento da aeração do meio, contribuindo, assim, para a remoção de petróleo.

O efeito positivo da temperatura sobre a remoção de petróleo é facilmente compreensível visto que o aumento na temperatura provoca um aumento na solubilidade dos hidrocarbonetos e na atividade enzimática dos microrganismos o que acaba por contribuir para o aumento da taxa de biodegradação. Porém, o aumento muito elevado, acima de 40ºC, torna a membrana mais suscetível à toxicidade dos hidrocarbonetos (LEAHY e COLLWELL, 1990). Sendo assim, o efeito negativo do termo quadrático da temperatura pode ser explicado pelo fato de um aumento muito brusco na temperatura provocar redução da atividade enzimática dos microorganismos, e consequentemente, reduzir a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos.

O efeito positivo apresentado pelo termo quadrático concentração inicial de petróleo pode ser explicado pelos níveis utilizados para essa variável (Tabela IV.3). O termo quadrático é gerado pelos pontos axiais, sendo que os pontos axiais apresentaram uma diferença muito grande (0,1 e 4,0% v/v), o nível +2 é 40 vezes maior do que o nível -2. Contudo, a remoção ocorrida no ensaio 21 (nível -2) foi apenas cerca de quatro vezes maior do que a ocorrida no ensaio 22 (nível +2) (Tabela V.4), dando a impressão de que um aumento muito brusco na concentração inicial de petróleo teria uma influencia positiva sobre a remoção deste. Na verdade o que deve ter acontecido no ensaio 21 foi a remoção completa, logo nos primeiros dias, de todos os compostos assimiláveis pela levedura, sendo os 10% que restaram compostos recalcitrantes e no ensaio 22 a remoção de um quinto do petróleo nas 120 horas de experimento, sendo que esses 20% devem ser os compostos mais leves, ou seja, mais facilmente e rapidamente consumidos.

A Tabela V.6 apresenta coeficiente de regressão, desvio padrão, o valor de t e o nível de significância p para a remoção de petróleo.

Figura V.6. Coeficientes de regressão no planejamento fatorial completo para remoção de óleo cru por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682.

	Coef. de regressão	Desvio	t(2)	p
Média	40,67	0,67	61,00	0,0003
Temperatura (L)	1,92	0,41	4,70	0,0425
Temperatura (Q)	-3,81	0,40	-9,64	0,0106
Agitação (L)	2,67	0,41	6,53	0,0226
Petróleo (L)	-14,33	0,41	-35,11	0,0008
Petróleo (Q)	3,68	0,40	9,32	0,0113
Inóculo (L)	11,50	0,41	28,17	0,0012
Petróleo/Inóculo	-2,12	0,50	-4,25	0,0511

A Tabela V.7 apresenta a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido foi de 0,97, e o F calculado cerca de 35 vezes maior que o valor tabelado. Foi ajustado um modelo de segunda ordem, incluindo os pontos axiais. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionado a falta de ajuste com exceção da interação concentração de petróleo/concentração de inóculo, pois como esta variável encontra-se na região da marginalidade ($0,1 < p > 0,05$), optou-se por não eliminá-la do modelo.

Tabela V.6. Análise da variância no planejamento fatorial completo para remoção de óleo cru por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682.

Fontes de variações	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{cal}
Regressão	9335,9	7	1333,70	88,98
Resíduos	284,8	19	14,99	
Falta de ajuste	276,8	17	16,28	
Erro puro	8,0	2	4,00	
Total	9620,7	26	370,03	

$F_{0,95;7;19} = 2,54$
$R^2 = 0,97$

Como o modelo apresentou um bom ajuste podemos analisar as superfícies de resposta. O modelo codificado obtido para descrever as superfícies de resposta da remoção de petróleo por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 está expresso na Equação V.1.

$$\%\,\mathrm{Re}\,moção = 40{,}67 + 1{,}92 \times temperatura - 3{,}81 \times temperatura^2 + 2{,}67 \times agitação - 14{,}33 \times [petróleo] + 3{,}68 \times [petróleo]^2 + 11{,}50 \times [inóculo] - 2{,}12 \times [petróleo] \times [inóculo] \qquad (V.1)$$

Com o objetivo de otimizar as condições de temperatura e agitação para remoção de petróleo, a Figura V.5 apresenta a superfície de resposta. Fixou-se a concentração de petróleo no nível -1 (1%v/v) e a concentração de inóculo no nível +1 (1,45 mg/mL).

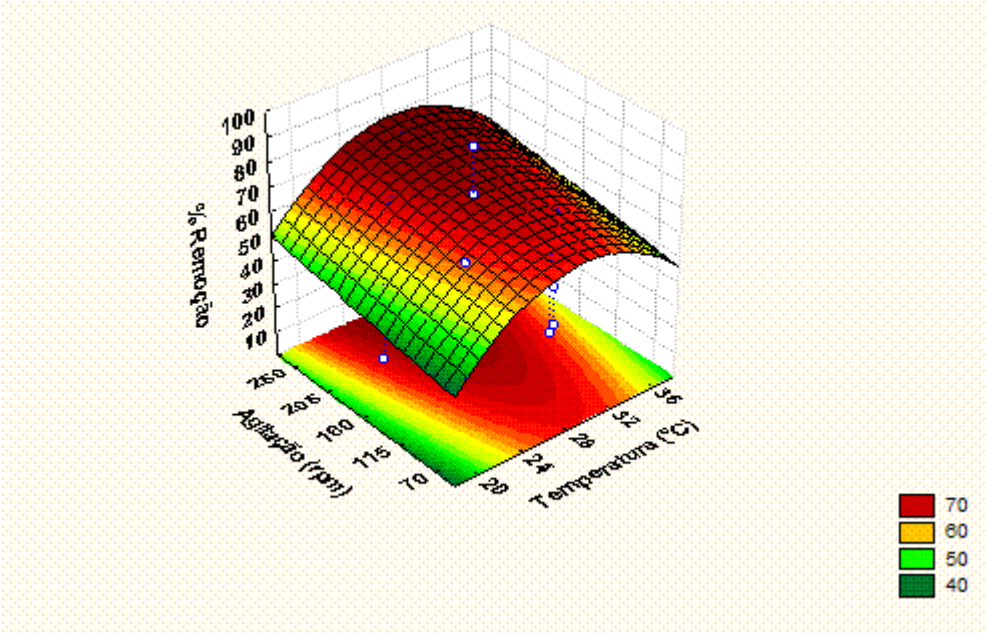

Figura V.7. Superfície de resposta da variável dependente remoção de petróleo em relação à agitação e temperatura.

Observa-se que os maiores valores de remoção de petróleo ocorreram quando a temperatura se encontra em torno do ponto central (28°C) e a agitação próximo ao nível

máximo (250 rpm). Podemos visualizar melhor através da curva de contorno representada na Figura V.6.

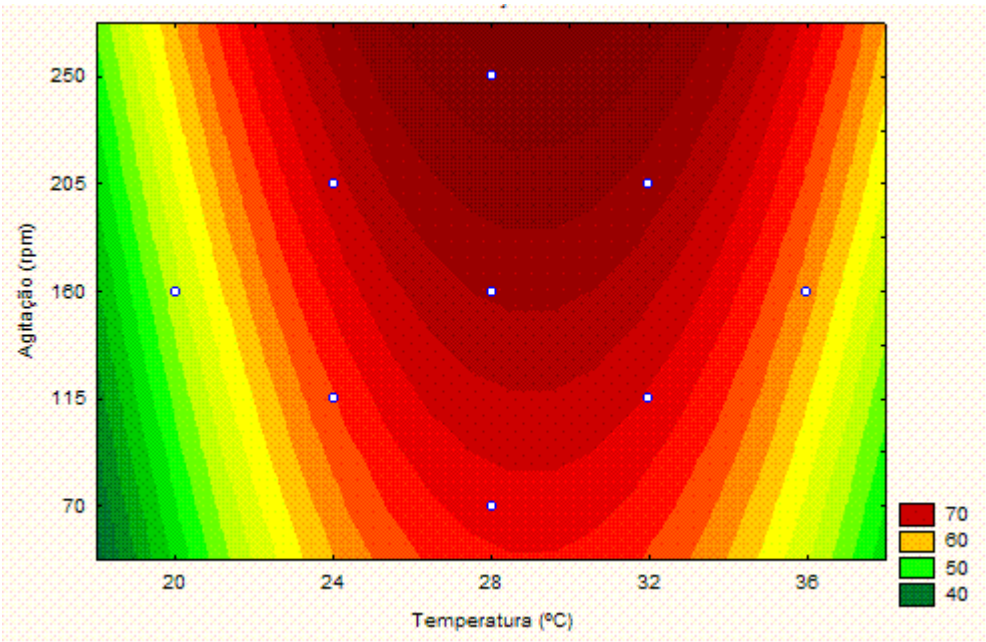

Figura V.8. Curva de contorno da remoção de petróleo em relação à agitação e temperatura.

Como toda a região marrom escuro apresentada na curva de contorno representa a região de intercessão entre as variáveis temperatura e agitação em que a porcentagem de remoção de petróleo é máxima, podemos escolher qualquer combinação de valores dessas variáveis que caia nessa região para melhorar as condições de biorremediação. Contudo, devemos escolher as condições que teremos menor gasto de energia, ou seja, menor temperatura e agitação possível. Sendo assim, dentre as condições estudadas, a melhor condição para remoção de petróleo por *Y. lipolytica* ocorrerá a temperatura de 28 C e a agitação de aproximadamente 230 rpm.

Podemos verificar que a extrapolação da variável temperatura (pontos axiais) provoca uma queda na remoção de petróleo. Porém, o mesmo não ocorre com a variável agitação. Quando esta tende ao nível superior (250 rpm), o que vemos não é uma queda da remoção de petróleo, e sim, um aumento. Sendo assim, não é possível comprovar que a agitação escolhida é a condição ótima para biorremediação. O que se pode afirmar é que

segundo o planejamento tanto a 230 rpm quanto a 250 rpm (máxima condição testada) não há diferença na remoção, optando-se assim pela agitação de 230 rpm. Porém, isso não quer dizer que acima de 250 rpm haja uma agitação que melhore ainda mais as condições de biorremediação. Contudo, sabe-se que haverá uma agitação em que a aeração chegará ao seu máximo, acima disso será indiferente aumentar a agitação, pois a taxa de transferência de oxigênio será máxima e isso limitará a biodegradação de hidrocarbonetos.

As maiores reduções na tensão superficial (23,23 e 22,01) foram obtidas nos ensaios 15 e 16, respectivamente, quando se realizou o experimento na maior concentração de petróleo, maior concentração de inóculo e maior agitação, sendo que no ensaio 15 (realizado na maior temperatura) a produção de biossurfactante foi ainda maior do que no ensaio 16 (realizado na menor temperatura) (Tabela V.4).

A Figura V.7 apresenta o diagrama de Pareto gerado pelo planejamento experimental realizado para produção de biossurfactante, calculados considerando diferentes tipos de interações entre as variáveis. Analisando-se o diagrama, podemos verificar que variável concentração inicial de petróleo (3) apresentou o maior efeito significativo sobre a variável resposta (α = 95%), seguida pela agitação (2), concentração de inóculo (4) e temperatura (1), sendo que todas essas variáveis apresentaram um efeito significativo positivo sobre a produção de biossurfactante. Os termos quadráticos e as interações não apresentaram efeitos significativos sobre a produção de biossurfactante (α = 95%). Na Tabela V.7 estão listados os valores dos efeitos de cada variável, bem como o desvio padrão, o valor de t e o nível de significância p.

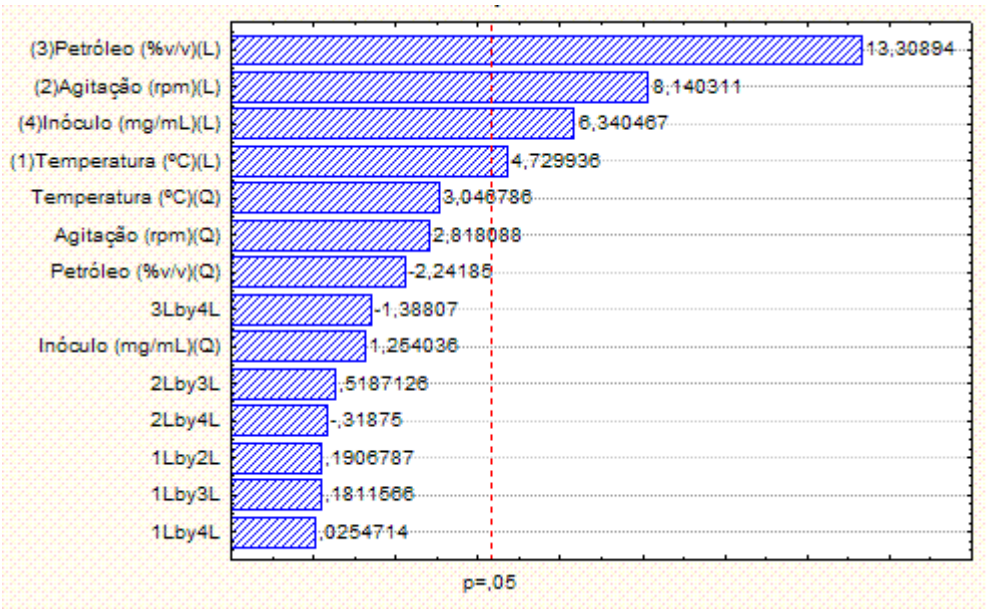

Figura V.9. Diagrama de Pareto gerado pelo Statistica 7.0 para analisar as variáveis que influenciam na produção de biossurfactante.

Tabela V.7. Efeitos das variáveis no planejamento fatorial completo para produção de biossurfactante por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682.

Variáveis	Efeito	Desvio	t(2)	P
Média	15,7	0,61	25,90	0,0015
Temperatura (L)	2,0	0,43	4,73	0,0419
Temperatura (Q)	1,4	0,45	3,05	0,0929
Agitação (L)	3,5	0,43	8,14	0,0148
Agitação (Q)	1,3	0,45	2,82	0,1062
Petróleo (L)	5,7	0,43	13,31	0,0056
Petróleo (Q)	-1,0	0,45	-2,24	0,1542
Inóculo (L)	2,7	0,43	6,34	0,0240
Inóculo (Q)	0,6	0,45	1,25	0,3365
Temperatura/Agitação	0,1	0,53	0,19	0,8664
Temperatura/Petróleo	0,1	0,53	0,18	0,8729
Temperatura/Inóculo	0,0	0,53	0,03	0,9820
Agitação/Petróleo	0,3	0,53	0,52	0,6556
Agitação/Inóculo	-0,2	0,53	-0,32	0,7801
Petróleo/Inóculo	-0,7	0,53	-1,39	0,2995

O efeito positivo da temperatura e agitação na produção de biossurfactante tem sido demonstrado em muitos trabalhos na literatura. Aeração e agitação são dois fatores importantes que influenciam na produção de biossurfactante, uma vez que facilitam a

transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa (SCHMIDELL, 2001). ADAMCZAK e BEDNARSKI (2000) avaliaram a influência da aeração na síntese de biossurfactante por *C. antarctica*. A maior produção de biossurfactante (45,5 g/L) foi alcançada quando a levedura foi cultivada com uma taxa de aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) e a concentração de oxigênio dissolvido controlada em 50% do valor da saturação. Entretanto quando se alterou a aeração para 2 vvm, houve uma produção intensa de espuma e a produção de biossurfactante decaiu 84%.

Com o objetivo de ampliar o processo de produção do bioemulsificante por *C. lipolytica*, da escala de frascos para a escala de biorreator, ALBUQUERQUE et al. (2006) estudaram os efeitos da agitação e da temperatura na produção de biossurfactante frente a diferentes óleos. Verificou-se o aumento da velocidade de agitação produziu um efeito positivo sobre a atividade de emulsificação de água em óleo de canola. As melhores condições de operação para a produção do biosurfactante foram temperatura de 28ºC e agitação de 300 rpm.

FONTES (2008) também estudou a influência da aeração e da agitação na produção de biossurfactante por *Y. lipolytica* e verificou que o maior índice de emulsificação (38,91%) e a maior redução da tensão superficial (14,39 mN/m) foram obtidos em uma agitação de 250 rpm (maior agitação testada) e com uma razão volume do meio/volume do frasco igual a 0,5.

Os maiores valores de atividade emulsionante detectados para os cultivos agitados em maior velocidade podem estar ligados à função fisiológica dos emulsionantes microbianos. Tem sido sugerido que a produção de bioemulsionantes pode aumentar a solubilização de substratos insolúveis em água e, conseqüentemente, facilitar o transporte de nutrientes para os microrganismos. Portanto, um maior estresse cisalhante pode induzir maior excreção de biossurfactantes já que o tempo de contato das gotas da fase orgânica, dispersas em água, com os microrganismos se torna mais difícil (AMARAL, 2007).

No caso de leveduras como *Y. lipolytica* um aumento na velocidade de agitação possivelmente favorece a liberação dos surfactantes preso à parede celular aumentando a quantidade de surfactante livres no meio reacional (FONTES, 2008). DESAI e BANAT (1997), em sua revisão, mencionaram que no caso de leveduras a produção de

biossurfactante geralmente aumenta com maiores velocidades de agitação e aeração, corroborando com os estudos realizados neste trabalho.

A maioria das fermentações realizadas para produção de biossurfactante ocorre em uma faixa de temperatura de 25 a 30°C. Existem vários trabalhos na literatura que estudam a influência desse parâmetro. CASAS e GARCIA–OCHOA (1999) mostraram que as quantidades de soforolipídeo obtidas por *C. bombicola* em ambas as temperaturas (25 e 30ºC) foram próximas. A fermentação realizada a 25ºC apresentou crescimento menor de biomassa e maior taxa de consumo de glicose em comparação à fermentação realizada a 30ºC.

DESPHANDE e DANIELS (1995) também avaliaram o efeito da temperatura no crescimento de *C. bombicola* e na produção de soforolipídeos. O crescimento celular máximo foi obtido a 30ºC, enquanto que a produção de soforolipídeos foi máxima a 27º C.

O efeito positivo das concentrações de inóculo e de petróleo já era esperado. Quanto maior a concentração de células maior será a produção de biossurfactante.

Como descrito no item III.3.3, muitos trabalhos reportam que a presença de um substrato hidrofóbico induz a produção de biossurfactante para facilitar o acesso ao substrato, como ocorreu neste trabalho.

A Tabela V.8 apresenta coeficiente de regressão, desvio padrão, valor de t e nível de significância p para a remoção de petróleo.

Tabela V.8. Coeficientes de regressão no planejamento fatorial completo para produção de biossurfactante por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682.

	Coef. de regressão	Desvio	t(2)	P
Média	16,7	0,20	82,57	0,0001
Temperatura (L)	1,0	0,21	4,73	0,0419
Agitação (L)	1,7	0,21	8,14	0,0148
Petróleo (L)	2,9	0,21	13,31	0,0056
Inóculo (L)	1,4	0,21	6,34	0,0240

A Tabela V.9 apresenta a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido foi de 0,72 e o F calculado cerca de 5 vezes maior que o valor tabelado. O

modelo não apresentou um bom ajuste, até porque o planejamento experimental realizado não visava a otimização da produção de biossurfactante, mas é o suficiente para analisar o efeito das variáveis estudadas na produção de biossurfactante por *Y. lipolytica*.

Tabela V.9. Análise da variância no planejamento fatorial completo para produção de biossurfactante por *Y. Lipolytica* IMUFRJ 50682.

Fontes de variações	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{cal}
Regressão	337,6	4	84,40	14,08
Resíduos	131,9	22	6,00	
Falta de ajuste	129,9	20	6,50	
Erro puro	2,0	2	1,00	
Total	469,5	26	18,06	

$F_{0,95;4;22} = 2,82$
$R^2 = 0,72$

V.3. Potencial degradador de *Y. lipolytica*

A biodegradação do petróleo consiste na degradação seletiva de determinados compostos orgânicos por ação dos microorganismos aeróbicos e/ou anaeróbicos. O processo de degradação tem início com a remoção dos hidrocarbonetos mais leves seguidos por outros progressivamente mais pesados na seguinte ordem: *n*-parafinas; isoprenóides; hopanos; esteranos; diasteranos; esteróides aromáticos e porfirinas (TAMANQUEIRA, 2006). O efeito causado pela biodegradação sobre a composição dos óleos é mostrado na Figura V.10.

O grau de biodegradação pode ser estimado quantitativamente mediante a análise das transformações observadas em alguns biomarcadores. Nesse estudo, análises pelo método CG-EM permitiram monitorar esses compostos.

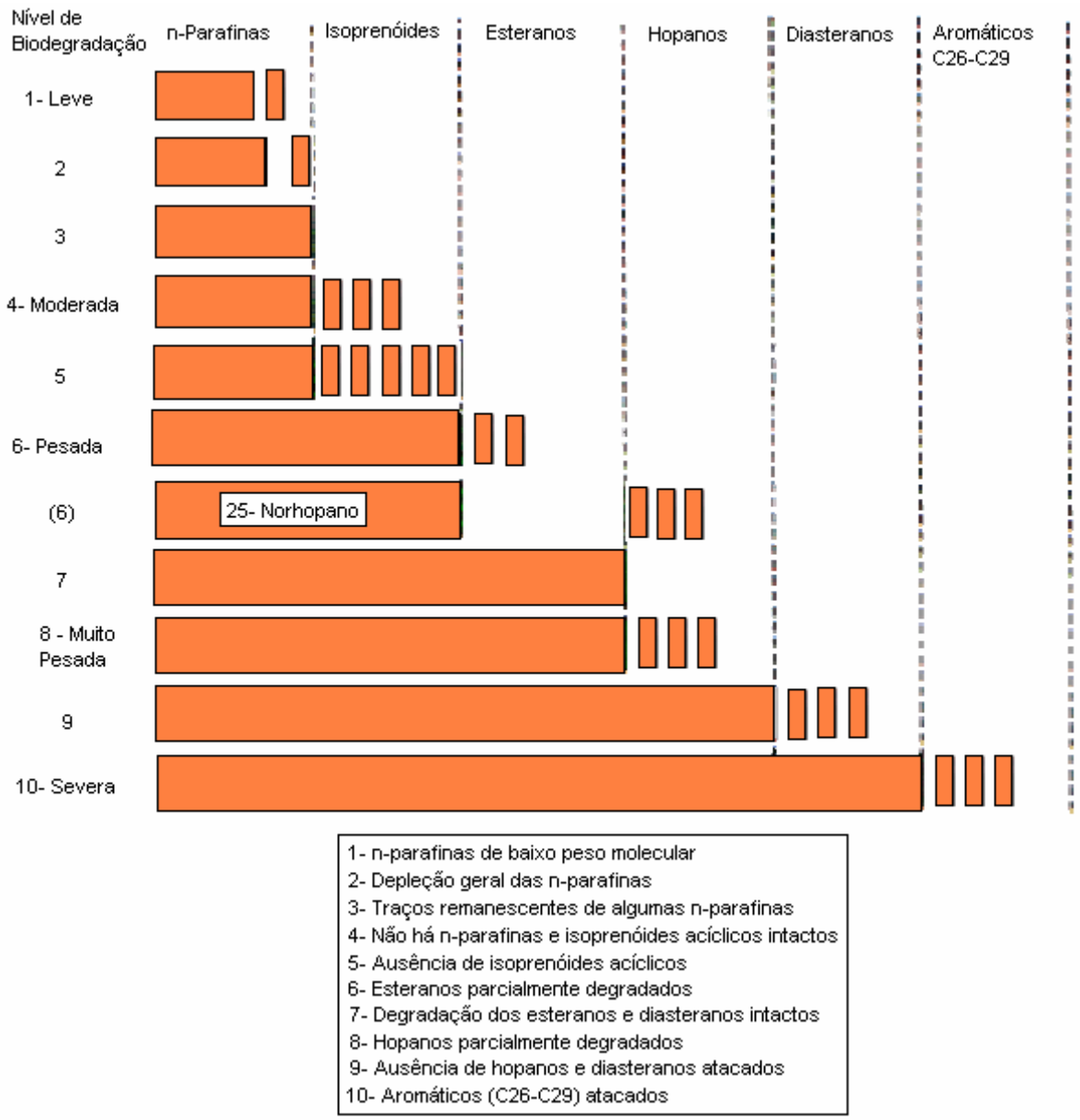

Figura V.10. Efeitos progressivos do nível de biodegradação sobre a composição dos óleos em função da intensidade da alteração em uma escala de 1 (leve) a 10 (severa) (TAMANQUEIRA, 2006).

A Figura V.11. apresenta o cromatograma de íons totais do óleo cru remanescente no ensaio controle e no ensaio 20, onde a porcentagem de remoção foi de cerca de 50%. O petróleo Marlin apresenta baixa concentração de n-parafinas, por isso, é considerado um óleo já biodegradado, apresentando maior concentração de compostos mais pesados. Isso já era esperado devido ao seu °API, que o caracteriza como um petróleo pesado. Através dos

cromatogramas, é possível observar também que após o processo de biodegradação a concentração dos compostos mais leves diminuiu, aumentando a proporção de compostos mais pesados (maior tempo de retenção) em relação aos compostos leves (menor tempo de retenção).

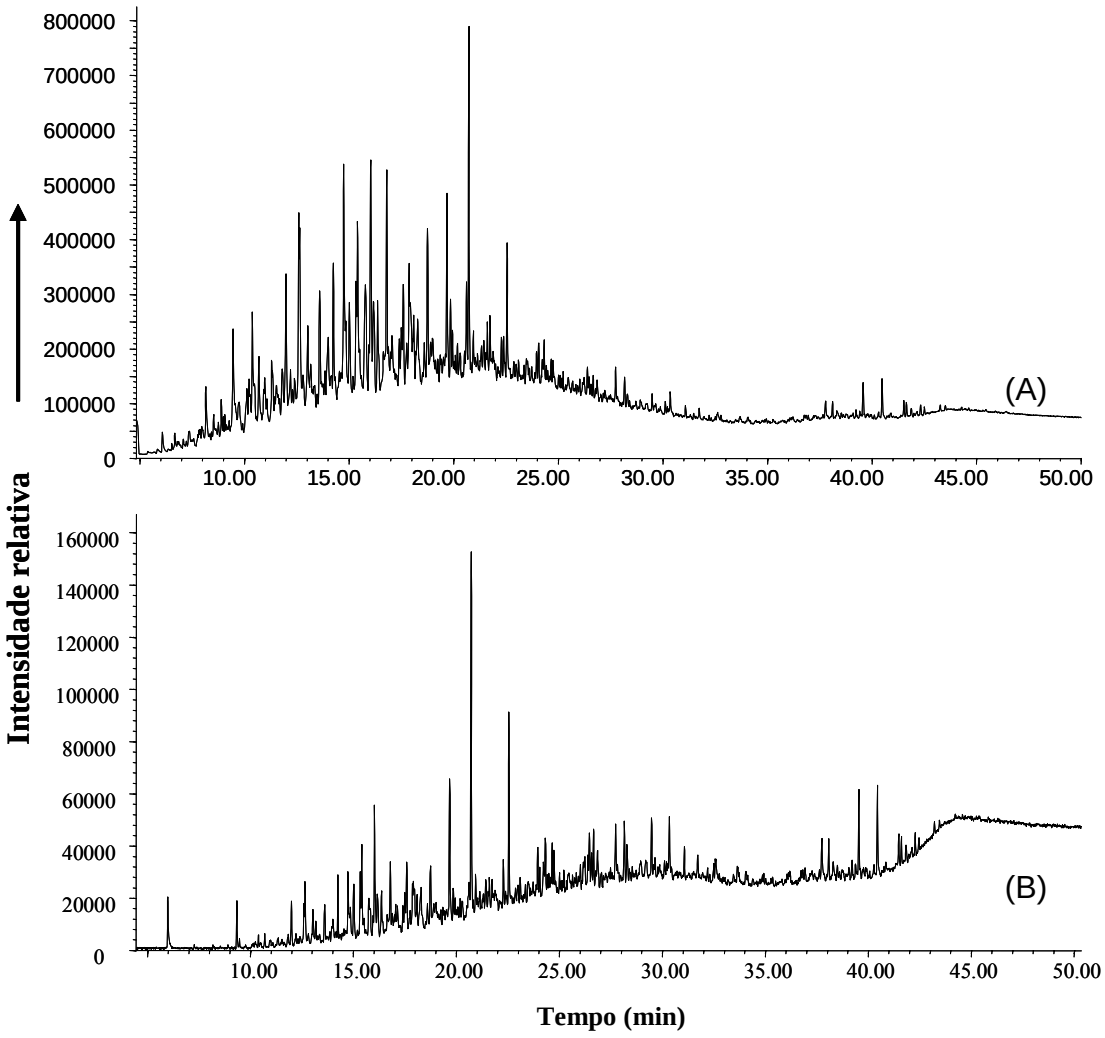

Figura V.11. Cromatogramas de íons totais do óleo cru remanescente no (A) ensaio controle abiótico e no (B) ensaio 20.

Os biomarcadores presentes em combustíveis fósseis mais estudados são: *n*-alcanos, hidrocarbonetos isoprenóides, terpanos e esteranos.

Os *n*-alcanos são caracterizados pelos fragmentos m/z 71, 85 e 99. Já os isoprenóides são caracterizados pelos fragmentos m/z 113, 183 e 197, sendo o pristano e fitano os mais comumente encontrados (AZEVEDO, 1990).

A Figura V.12 apresenta os fragmentogramas m/z 85 do óleo cru remanescente no ensaio controle, no ensaio 20 e no ensaio 21. Podemos verificar a presença das *n*-parafinas e dos isoprenóides pristano e fitano. Após o processo de biodegradação a concentração desses compostos reduz significativamente no ensaio 20 (Figura V.12(B)). Já no ensaio 21 (Figura V.12(C)) onde as condições de biodegradação foram mais severas, pois a concentração de petróleo inicial foi menor e a concentração de microorganismos maior, esses compostos foram completamente consumidos. É valido ressaltar que as análises de CG-EM nos fornecem informações qualitativas a respeito das amostras, contudo, foi possível comparar as amostras quantitativamente através da intensidade dos picos, pois as suas concentrações eram conhecidas. A concentração do óleo cru presente no ensaio controle era a mesma do ensaio 20. Já o ensaio 21 apresentava 20 vezes menos petróleo.

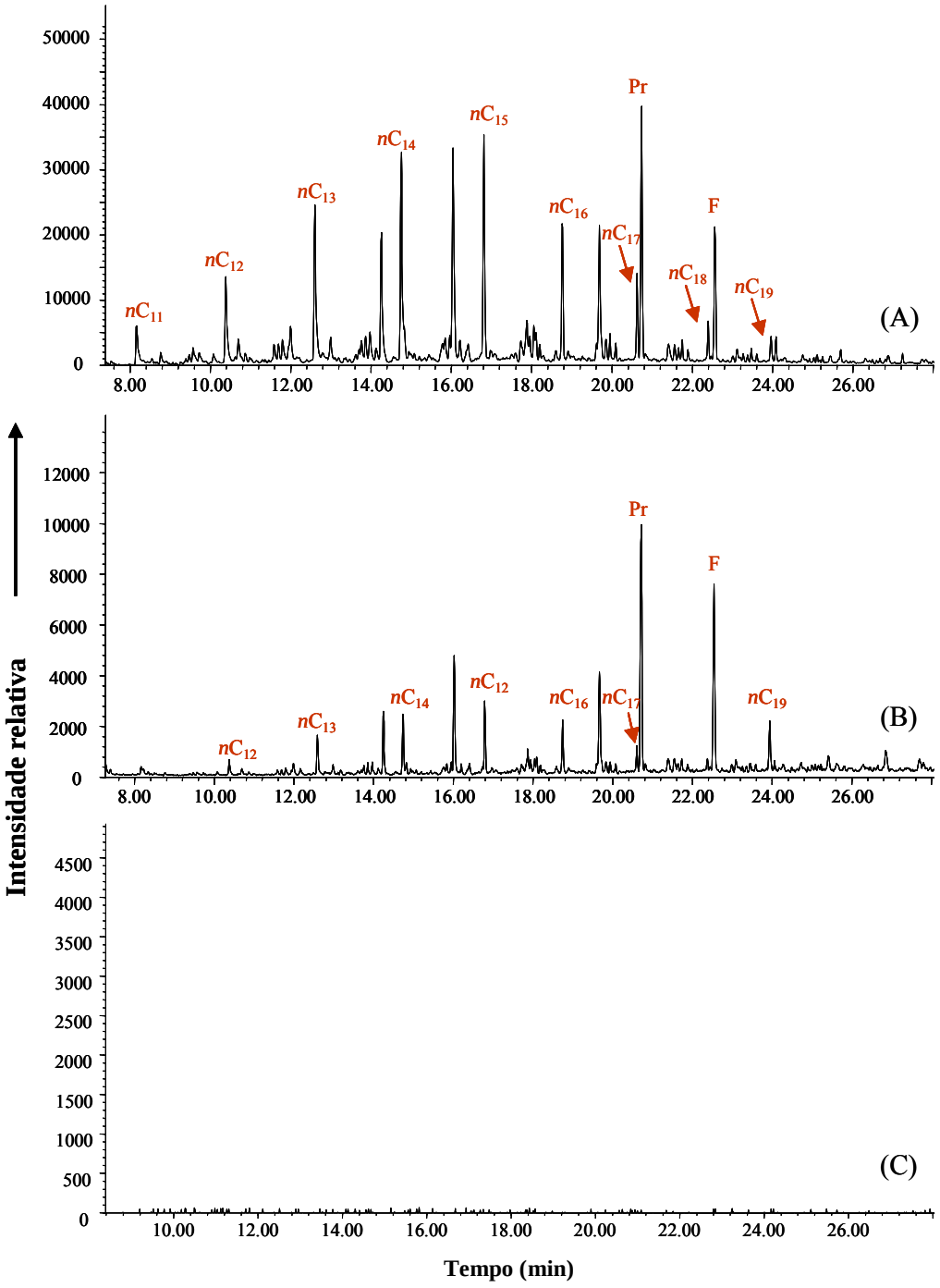

Figura V.12. Fragmentogramas m/z 85 do óleo cru remanescente no (A) ensaio controle abiótico, (B) no ensaio 20 e no (C) ensaio 21.

Os terpanos podem ser divididos em três grupos principais: tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos .

Os terpanos tricíclicos ocorrem como uma série homóloga com um número de átomos de carbono variando de C_{19} até C_{54}. Os terpanos tetracíclicos são restritos a compostos de C_{24} a C_{27}, e derivam, possivelmente da degradação de triterpanos pentacíclicos (WIEDEMANN, 2006).

Hopanos são os mais comuns e bem estudados terpenóides pentacíclicos presentes em sedimentos ricos em matéria orgânica e petróleos. A cadeia lateral na posição C-21 pode ter até oito carbonos, originando os hopanos estendidos que variam de C_{27} a C_{35} e que não incluem o membro C_{28}, o qual é menos comum (WIEDEMANN, 2006).

A Figura V.13 apresenta fragmentogramas m/z 191, característico dos terpanos. Foi possível detectar a presença de alguns terpanos tricíclicos (Tr) e alguns hopanos (H). Contudo, não foi possível afirmar que tais compostos tenham sido consumidos pelo microrganismo em questão, pois a diferença entre a abundância dos terpanos presentes óleo remanescente no ensaio controle e no ensaio 20 não foi muito expressiva. Além disso, a concentração desses compostos é tão pequena, que no ensaio 21 não foi detectada sua presença. Isso pode ter ocorrido porque estes compostos foram consumidos ou porque a concentração era tão pequena que se confundiu com o ruído do cromatograma.

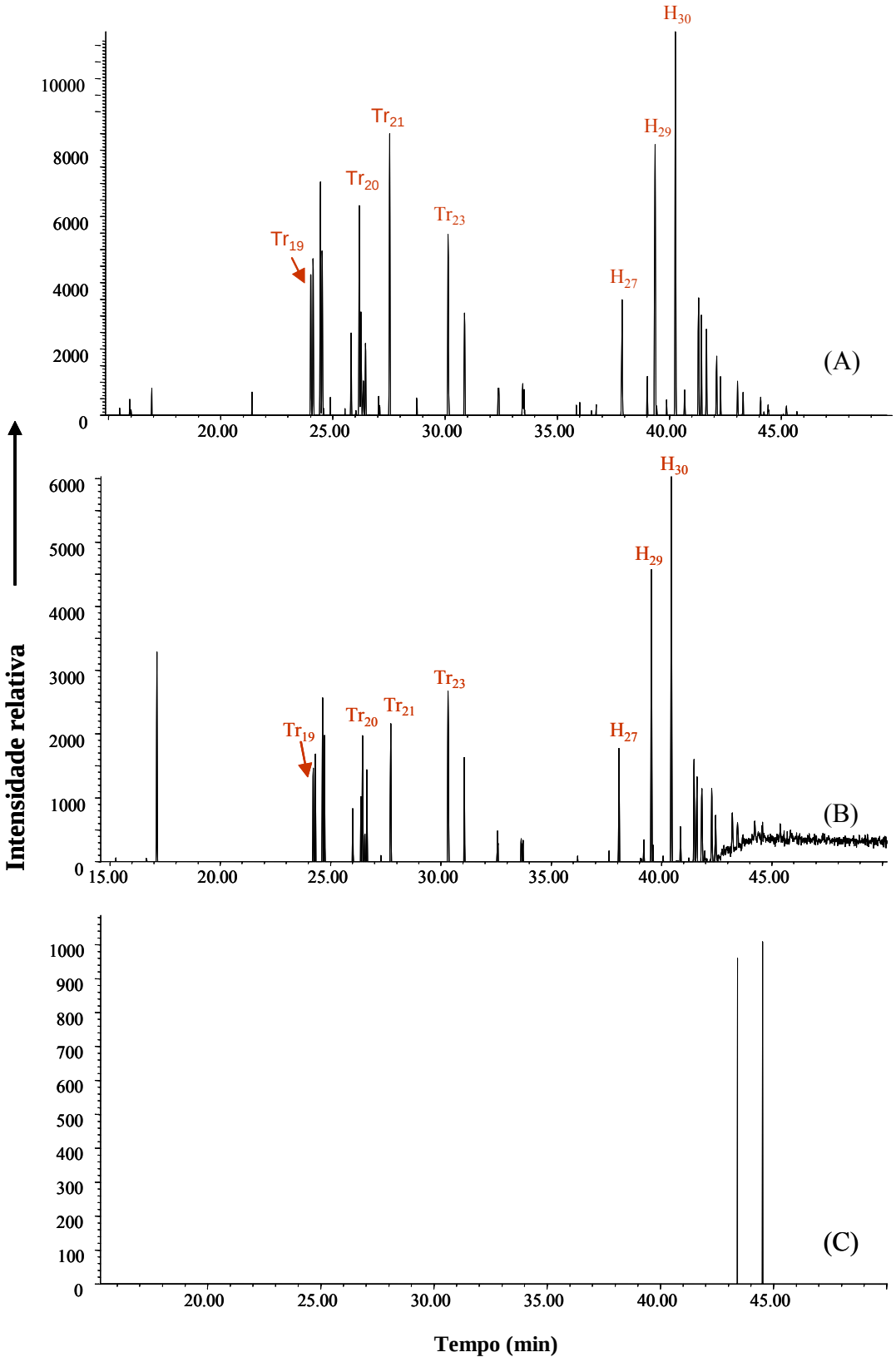

Figura V.13. Fragmentogramas m/z 191 do óleo cru remanescente no (A) ensaio controle abiótico, (B) no ensaio 20 e no (C) ensaio 21.

Além destes compostos também foram estudados os hidrocarbonetos aromáticos cujos biomarcadores são os esteranos monoaromáticos e triaromáticos, fenantrenos e metilfenantrenos, naftalenos e metilnaftalenos (WIEDEMANN, 2006).

A classe dos naftalenos, metilnaftalenos, dimetilnaftalenos e trimetilnaftalenos são caracterizadas pelos fragmentos m/z 128, m/z 142, m/z 156 e m/z 170, respectivamente. A Figura V.14 mostra os fragmentogramas referentes a essas classes.

É possível verificar que o naftaleno foi facilmente consumido por *Y. lipolytica*, sendo totalmente degradado nos ensaios 21 e 20. Os grupos dos metilnaftalenos e dos dimetilnaftalenos também foram consumidos pela levedura. A biodegradação desses compostos parece seguir uma ordem. Após a degradação do naftaleno, a biodegradação do grupo dos metilnaftalenos se intensifica, o que pode ser observado através da diminuição da abundância dos metilnaftalenos em relação aos dimetilnaftalenos. Em seguida, com a ausência dos metilnaftalenos é a vez dos dimetilnaftalenos sofrerem degradação, o que também pode ser observado através da diminuição da abundância dos dimetilnaftalenos em relação aos trimetilnaftalenos. Contudo, os trimetilnaftalenos também foram consumidos, porém em menor quantidade que os outros grupos, possivelmente porque sua degradação só seria efetiva após a ausência de todos os compostos mais facilmente assimiláveis (naftalenos, metilnaftalenos e dimetilnaftalenos).

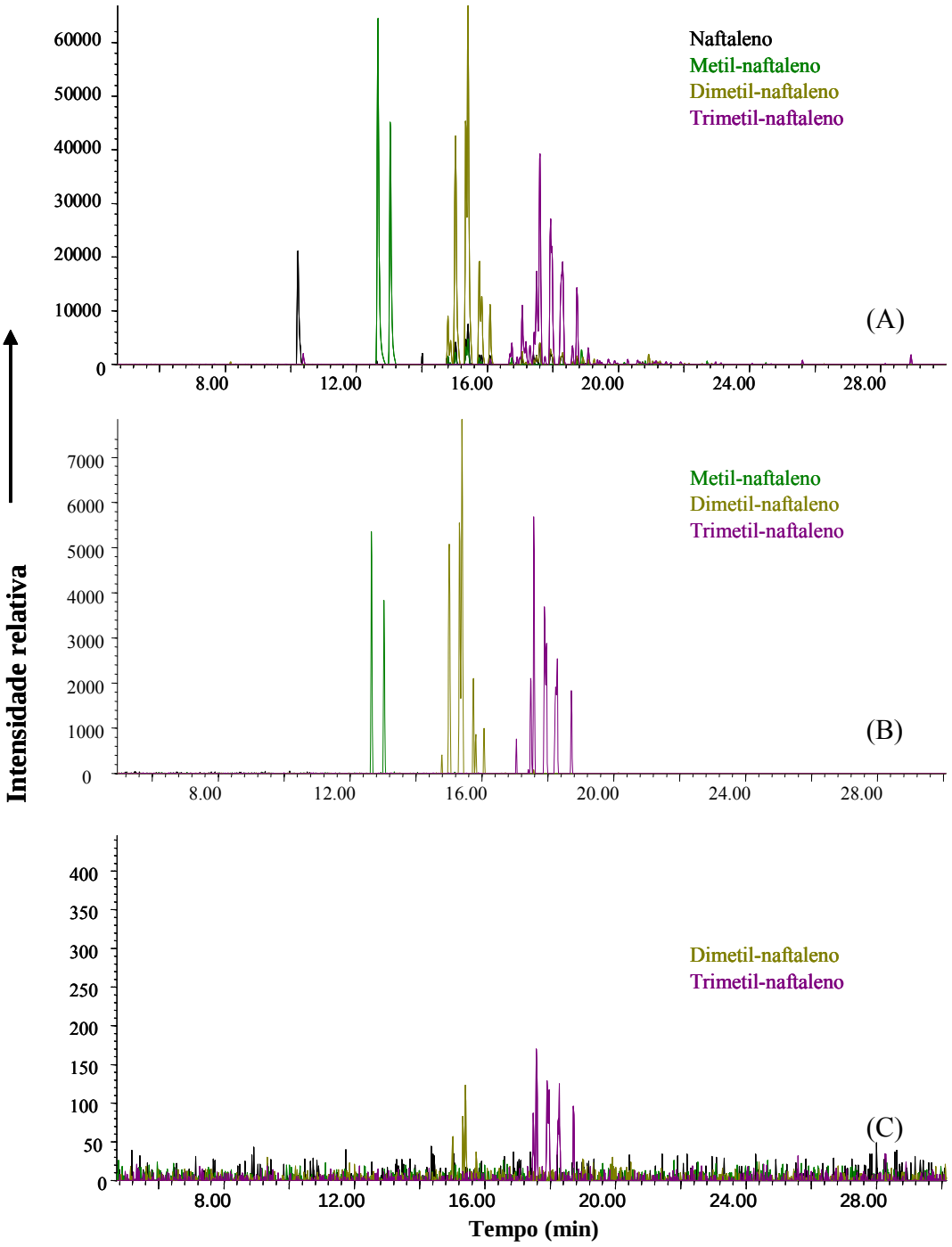

Figura V.14. Fragmentogramas m/z 128, m/z 142, m/z 156 e m/z 170 do óleo cru remanescente no (A) ensaio controle abiótico, (B) no ensaio 20 e no (C) ensaio 21.

A classe dos fenantrenos, metilfenantrenos e dimetilfenantrenos são caracterizadas pelos fragmentos m/z 178, m/z 192 e m/z 206, respectivamente. A Figura V.15 mostra os fragmentogramas referentes a essas classes.

Y. lipolytica é capaz de absorver compostos triaromáticos. A biodegradação desses compostos parece seguir a mesma sequência dos diaromáticos. O fenantreno é mais facilmente assimilável, seguido dos metilfenantrenos e dimetilfenantrenos.

Os resultados estão de acordo com os obtidos por CHALLIN *et al.*(2004). CHALLIN *et al.* (2004) analisaram a capacidade biodegradadora de quato leveduras, sendo uma das cepas da espécie *Yarrowia lipolytica*. Esta espécie foi capaz de consumir *n*-alcanos, isoalcanos, pristano, fitano, alcanos cíclicos, hidrocarbonetos aromáticos e até mesmo alguns aromáticos policlícos.

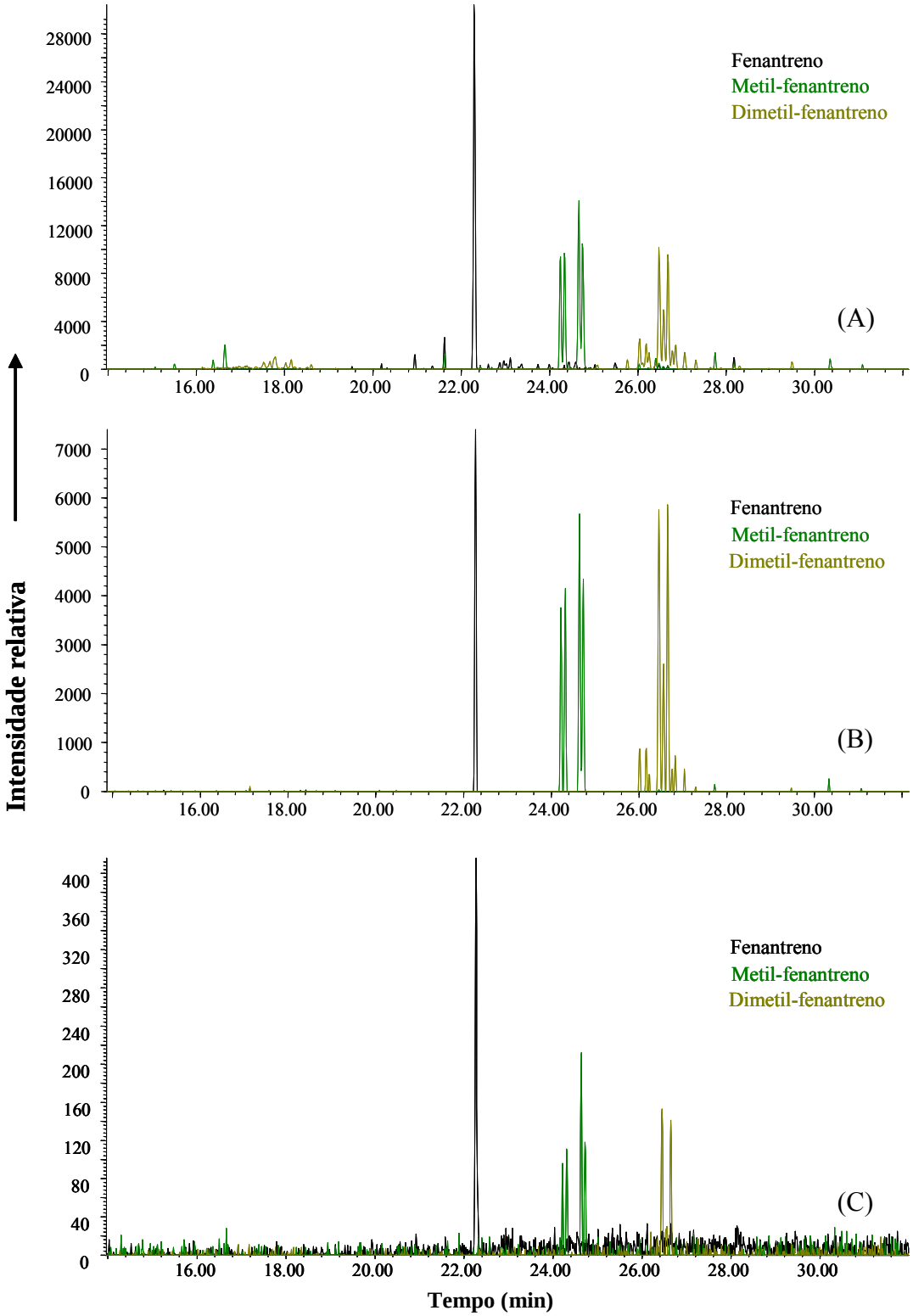

Figura V.15. Fragmentogramas m/z 178, m/z 192 e m/z 206 do óleo cru remanescente no (A) ensaio controle abiótico, (B) no ensaio 20 e no (C) ensaio 21.

V.4. Crescimento de *Y. lipolytica* em glicerol

A literatura tem reportado alguns trabalhos que mostram que *Yarrowia lipolytica* é capaz de consumir glicerol como foi citado no item III.3.5. Porém, em todos esses trabalhos foram adicionados nutrientes como, por exemplo, sulfato de amônio e/ou extrato de levedo. Sendo assim, foi realizado um experimento em meio mineral contendo somente glicerol, sem a adição de nenhum nutriente, com o intuito de verificar se a levedura *Y. lipolytica* seria capaz de metabolizar o glicerol mesmo na ausência dos nutrientes normalmente adicionados ao meio.

A Figura V.16 mostra o perfil de crescimento celular e consumo de glicerol de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo glicerol 2%. Os resultados mostram que a cepa é capaz de consumir glicerol, crescendo em meio contendo este substrato como única fonte de carbono. Porém, assim como ocorreu em meio contendo glicose como fonte de carbono, a cepa não apresentou produção significativa de biossurfactante (Tabela V.10), reduzindo a tensão superficial em apenas cerca de 7 mN/m. Isso se deve possivelmente ao fato do glicerol, assim como a glicose, ser um substrato hidrofílico, logo, não há necessidade de produzir biossurfactante para facilitar o acesso ao substrato.

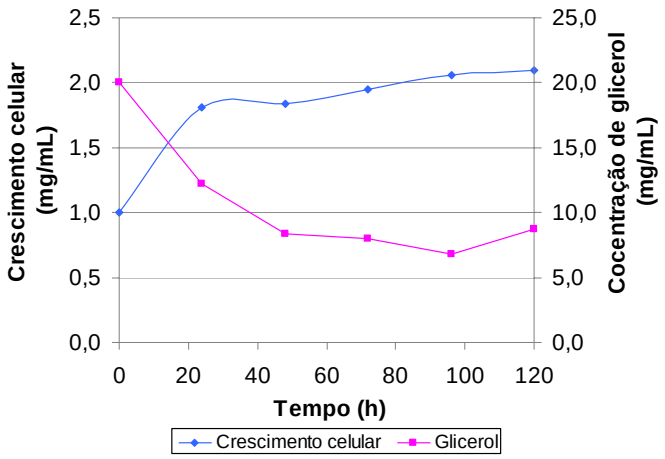

Figura V.16. Perfil de crescimento celular e consumo de glicerol de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo glicerol 2%.

Tabela V.10. Tensão superficial do meio mineral contendo 2% de glicerol no início e no final do experimento.

Tensão superficial (mN/m)	
Início	**Final**
64,535 ± 0,085	56,708 ± 0,106

Muitos trabalhos mostram que *Y. lipolytica* metaboliza glicerol produzindo ácidos orgânicos, alguns de interesse como os ácidos cítrico e pirúvico. O ácido cítrico, por exemplo, é normalmente produzido e excretado sob condições limitantes de nitrogênio (PAPANIKOLOAU *et al*., 2002). Para verificar se houve produção de ácidos orgânicos o pH foi medido no início e final do experimento. A Tabela V.11 mostra os valores de pH medidos.

Tabela V.11. pH do meio mineral contendo 2% de glicerol no início e no final do experimento.

pH	
Início	**Final**
5,98	3,03

Podemos verificar que houve uma redução significativa no pH do meio, indicando grande possibilidade de produção de ácidos orgânicos.

Foi realizado também um experimento contendo glicerol e petróleo como fontes de carbono. A Figura V.17 mostra o perfil de crescimento celular e consumo de glicerol de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo glicerol 2% e petróleo 1%.

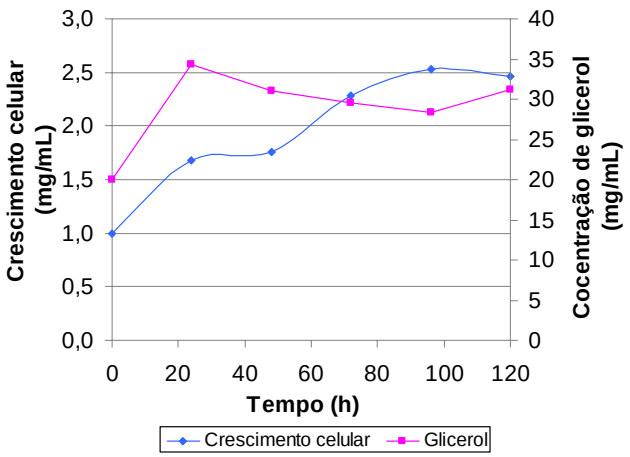

Figura V.17. Perfil de crescimento celular e consumo de glicerol de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio mineral contendo glicerol 2% e petróleo 1%.

O perfil de crescimento celular foi semelhante ao obtido no experimento contendo somente glicerol como fonte de carbono. Ao final das 120 horas a concentração celular atingiu aproximadamente 2,5 mg/mL enquanto que no experimento anterior (somente glicerol como fonte de carbono) atingiu cerca de 2,0 mg/mL.

Com relação ao consumo de glicerol, o *kit* utilizado para tal análise é um *kit* de dosagem de triglicerídeos totais, não é específico para glicerol, tendo interferência de qualquer lipídio presente no meio de cultivo, principalmente triglicerídeos e ácidos graxos livres. Sendo assim, a curva referente ao consumo de glicerol nas Figuras V.5 e V.6 na verdade é uma curva da concentração de lipídios presente no meio de cultivo, sendo um balanço entre o que está sendo produzido e o que está sendo consumido.

Analisando as Figuras V.16 e V.17 é possível perceber que a partir do 3 dia (48 h) a "concentração de glicerol", ou seja, o balanço de lipídios, fica praticamente constante. O mesmo foi observado por KAMZOLOVA *et al*. (2005) crescendo *Yarrowia lipolytica* em meio contendo óleo de colza como única fonte de carbono. KAMZOLOVA *et al*. (2005) observaram também que *Yarrowia lipolytica* produzia e excretava lipase, enzima capaz de hidrolisar lipídios em ácido graxo e glicerol. Sendo assim, o meio de cultivo apresentou elevada concentração de glicerol e ácidos graxos livres, que se manteve constante durante a fermentação.

No experimento contendo glicerol e petróleo (Figura V.17), a concentração de lipídios foi bem superior. Isso se deve possivelmente a metabolização do óleo cru. Como mostra a Figura III.10 os alcanos sofrem uma sequência de reações de oxidação sendo levados a ácidos graxos.

No final do experimento foi analisada a quantidade de petróleo presente e verificou-se que cerca de 32% do óleo cru foi consumido. Os resultados indicam que os dois substratos disponíveis foram consumidos simultaneamente, o que está de acordo com o observado por PAPANIKOLOAU *et al*. (2003) crescendo *Yarrowia lipolytica* em meio contendo mistura de glicerol e estearina (derivado industrial de gordura animal composto de 100% de ácidos graxos livres). KAMZOLOVA *et al*. (2005) também verificaram que *Yarrowia lipolytica* foi capaz de consumir simultaneamente o glicerol e os ácidos graxos livres proveniente da hidrólise do óleo de colza.

V.5. Caracterização da parede celular de *Y. lipolytica*

Como já foi mencionado anteriormente, o teste MATS é capaz de analisar a hidrofobicidade celular a partir da porcentagem de adesão das células ao hexadecano. A fim de se conhecer melhor a superfície celular da cepa em questão, foi realizado teste MATS. Os resultados obtidos mostraram elevada adesão das células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, indicando que esta cepa apresenta elevado caráter hidrofóbico.

O teste MATS foi também realizado com a cepa *Y. lipolytica* W29 e com *S. cerevisiae*, com objetivo de comparar as características da superfície celular das diferentes cepas de *Y. lipolytica* entre si e com uma espécie com superfície celular hidrofílica. Os resultados são apresentados na Tabela V.12.

Tabela V.12. Hidrofobicidade detectada pelo teste MATS para duas cepas de *Y. lipolytica* e para uma cepa de *S. cerevisiae* crescidas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm.

Cepa	Hidrofobicidade (% Adesão)
Y. lipolytica IMUFRJ 50682	91,3 ± 1,8
Y. lipolytica W29 (ATCC20460)	53,5 ± 1,4
S. cerevisiae mh1	0,9 ± 0,1

.

A Tabela V.12 mostra que a cepa IMUFRJ 50682 é mais hidrofóbica que a cepa W29. Em relação à cepa de *S. cerevisiae*, o teste detecta uma hidrofobicidade quase insignificante. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por AMARAL (2007).

A parede celular de *Yarrowia lipolytica* é constituída principalmente por polissacarídeos (70% ± 5%), proteínas (15% ± 1%) e lipídeos (5% ± 1%) (VEGA E DOMÍNGUEZ, 1986). Sendo assim, investigou-se a contribuição dos principais componentes da parede celular (polissacarídeos e proteínas) na elevada hidrofobicidade apresentada pela cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Para analisar a influência das proteínas na hidrofobicidade celular, tal microorganismo foi submetido ao tratamento com pronase, enzima capaz de hidrolisar proteínas, e a hidrofobicidade foi analisada ao longo da reação enzimática.

Na Figura V.18 podemos verificar que a hidrofobicidade reduziu gradativamente durante as primeiras 8 horas de tratamento enzimático com pronase, com uma redução de aproximadamente 50% na hidrofobicidade da superfície celular. Após esse tempo não há redução significativa.

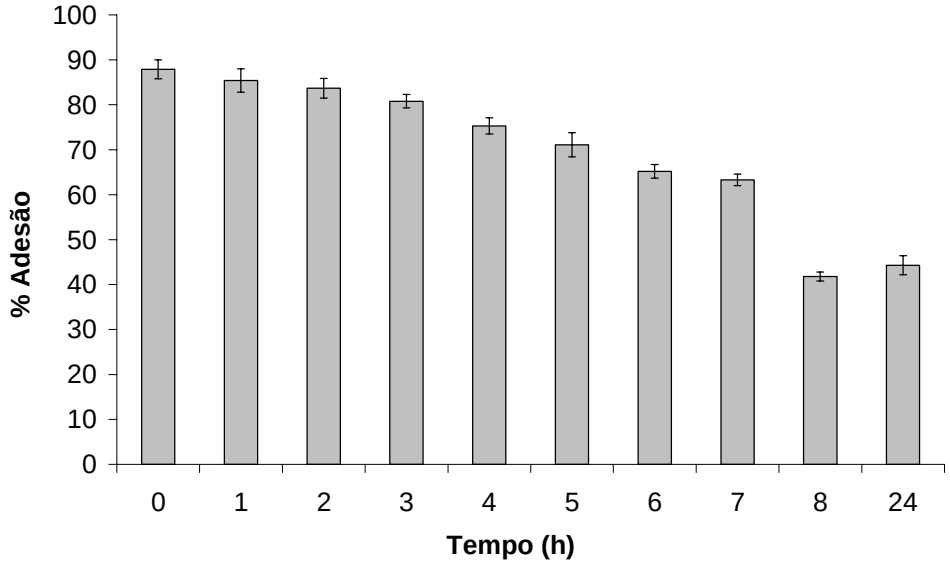

Figura V.18. Hidrofobicidade da superfície celular obtida pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm e tratadas com pronase.

Com intuito de verificar a ação da pronase sobre as proteínas da superfície celular, ao final das 24 horas de incubação foi analisada a quantidade de proteína no sobrenadante da reação. Analisou-se também a quantidade de proteína da suspensão enzimática utilizada (pronase) para que o valor de proteína desta suspensão fosse descontado do valor de proteína encontrado no final do tratamento. Os valores encontrados nas análises de proteínas são apresentados na Tabela V.13.

Tabela V.13. Quantidade de proteína obtida pelo método de Lowry (1951) da solução de pronase utilizada e do sobrenadante da reação enzimática com pronase de *Y. lipolytica* cultivadas em YPD.

	Concentração de proteína (mg/mL)
Solução Enzimática	0,100
Sobrenadante da reação	0,250

Durante as 24 horas de reação enzimática foram liberadas cerca de 0,150 mg/mL de proteína, cerca de 0,025 mg de proteína/mg de células, comprovando a hidrólise parcial de proteínas presentes na superfície celular de *Y lipolytica*.

A fim de verificar se o tratamento enzimático com pronase estava provocando modificações na parede celular de *Y. lipolytica* foi realizada microscopia eletrônica de transmissão da célula íntegra e da célula tratada com pronase. A Figura V.13 mostra as microscopias eletrônicas realizadas.

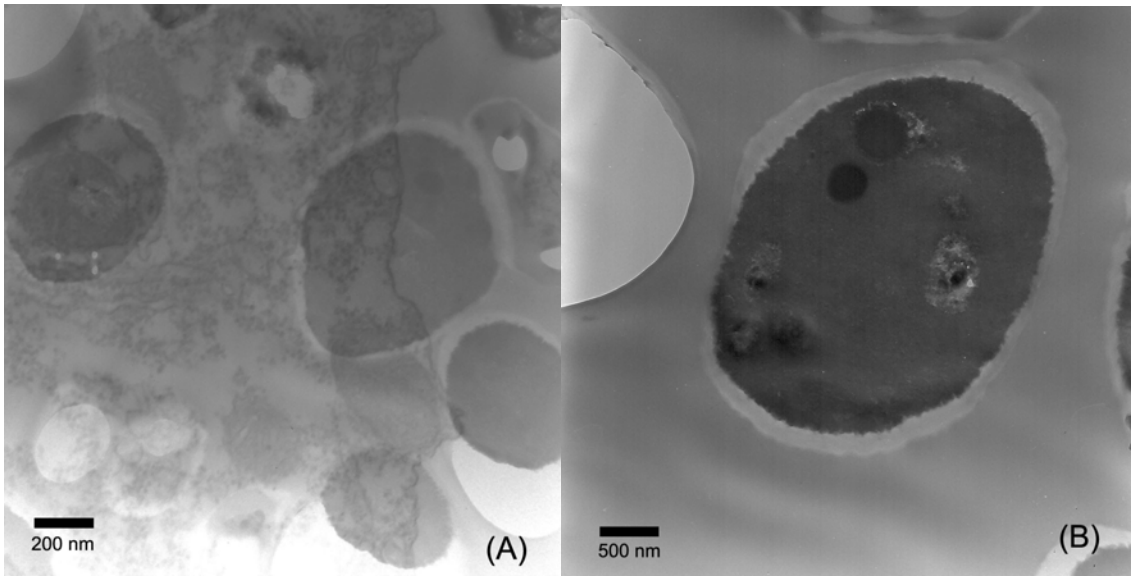

Figura V.19. Microscopia eletrônica de transmissão de (A) células integras e (B) células tratadas com pronase.

Observando as Figuras V.13(A) e V.13(B) podemos verificar que aparentemente não houve modificação na estrutura da parede celular. É possível que as proteínas presentes na superfície da célula tenham sofrido hidrólise, e isto, tenha gerado uma desestruração superficial na parede celular, diminuindo a hidrofobicidade celular.

Em paralelo, realizou-se também um branco contendo somente as células suspensas em tampão Tris-HCl 0,01M para verificar se a incubação a esta temperatura alteraria a hidrofobicidade da superfície celular. O branco foi também incubado a 37ºC em um banho com agitação por 24 horas. Ao final, analisou-se a hidrofobicidade celular pelo teste MATS e pode-se verificar que esta praticamente não foi afetada pela incubação das células a 37ºC como mostra a Tabela V.14.

Tabela V.14. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD antes e após incubação a 37ºC por 24 horas.

Hidrofobicidade (% Adesão)	
Início	**Final**
87,9 ± 2,1	84,1 ± 1,5

Após verificar a influência das proteínas no fenômeno da hidrofobicidade celular, analisou-se também a influência dos polissacarídeos na hidrofobicidade celular. *Y. lipolytica* foi submetida ao tratamento com amiloglucosidase, enzima capaz de hidrolisar polissacarídeos, e a hidrofobicidade foi analisada ao longo da reação enzimática.

Na Figura V.20 podemos verificar o mesmo perfil observado na hidrólise com pronase. A hidrofobicidade foi reduzida gradativamente durante a hidrólise enzimática com amiloglucosidase, com uma redução de aproximadamente 50% na hidrofobicidade da superfície celular. Simultaneamente, realizou-se também um branco contendo somente as células suspensas em tampão acetato 0,2M e ácido acético 3M para verificar se a incubação a estas temperatura mudaria a hidrofobicidade da superfície celular. O branco foi também incubado a 65ºC em um banho com agitação por 30 minutos. A temperatura foi reduzida para 57°C por 2 horas e, em seguida, reduzida novamente para 37°C por mais 22 horas. Ao final de cada etapa, analisou-se a hidrofobicidade celular pelo teste MATS e pode-se verificar que esta não foi afetada pela incubação das células, mantendo-se praticamente constante como mostra a Tabela V.15.

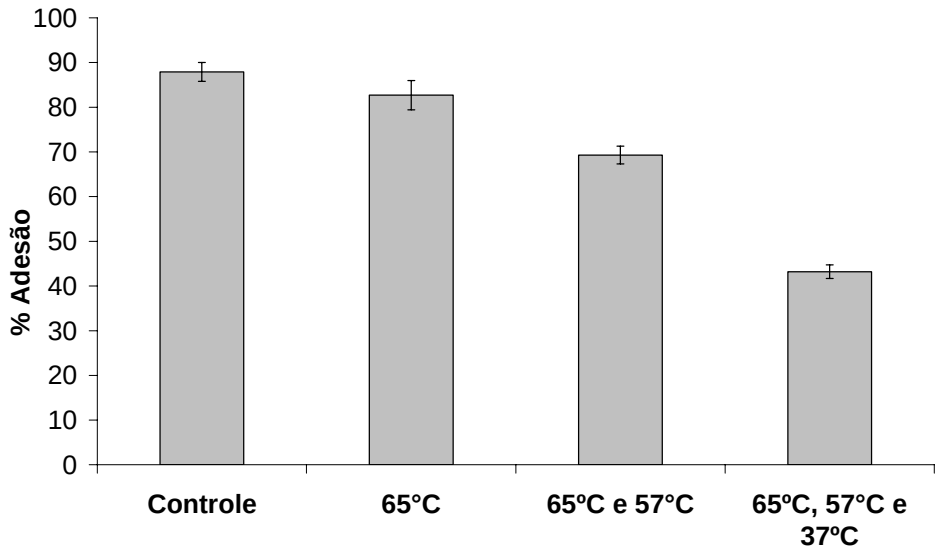

Figura V.20. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm e tratadas com amiloglucosidase.

Tabela V.15. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD após incubação a 65°C por 30 minutos, 57°C por 2 horas e 37°C por 22 horas.

	Hidrofobicidade (% Adesão)
Controle	91,3 ± 1,1
65°C	89,4 ± 1,9
65ºC e 57°C	87,9 ± 2,1
65ºC, 57°C e 37ºC	84,5 ± 2,3

Para verificar se havia ou não impedimento estérico da ação da amiloglicosidase na superfície celular, ao final de cada etapa de hidrólise foi analisada a quantidade de glicose livre no sobrenadante da reação. Os valores encontrados nas análises de glicose são apresentados na Tabela V.16.

Tabela V.16. Quantidade de glicose livre dada pelo método da glicose oxidase do sobrenadante da reação enzimática com amiloglucosidase de *Y. lipolytica* cultivadas em YPD.

	mg de glicose/mg de célula
65°C/30 min	0,028
57°C/2h	0,053
37°C/22h	0,127

Durante 22 horas de reação enzimática foram liberadas cerca de 0,208 mg de glicose/ mg de célula, comprovando a hidrólise de polissacarídeos presentes na superfície celular de *Y. lipolytica*.

Células íntegras e células tratadas com amiloglucosidase foram submetidas a microscopia eletrônica de transmissão para observar as modificações ocorridas na parede celular de *Y. lipolytica* devido ao tratamento enzimático com amiloglucosidase. A Figura V.21 mostra as microscopias eletrônicas realizadas.

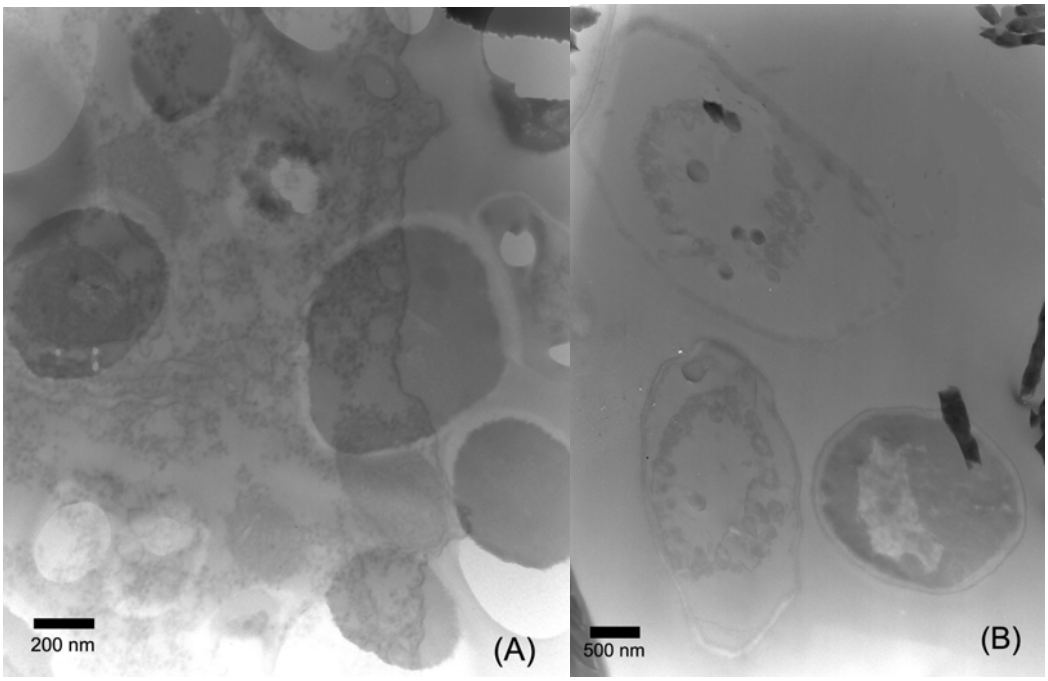

Figura V 21. Microscopia eletrônica de transmissão de (A) células integras e (B) células tratadas com amiloglucosidase.

A Figura V.21(B) mostra uma desestruturação da parede celular com perda de material intracelular, o que possivelmente resultou na redução da hidrofobicidade celular.

Os polissacarídeos presentes na parede celular de *Y. lipolytica* são β-glucana, manana e quitina (VEGA E DOMÍNGUEZ, 1986). A β-glucana é um polissacarídeo formado por resíduos de glicose unidos por ligações β-1,3 glicosídicas contendo ramificações β-1,6. A manana é um polissacarídeo formado por resíduos de manose ligados por ligações α-1,6 com ramificações α-1,2 e α-1,3. A quitina é um polissacarídeo formado por unidades de N-acetilglicosamina unidas por ligações glicosídicas β-1,4.

Durante a síntese da parede celular, esses polissacarídeos são sintetizados individualmente e depois ligados covalentemente a proteínas, formando o principal constituinte da parede celular de leveduras, as glicoproteínas (FARKAS, 1979).

Tanto durante a hidrólise de proteínas como durante a hidrólise de polissacarídeos ocorreu uma redução significativa na hidrofobicidade celular da cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Esses resultados indicam um possível envolvimento das glicoproteínas da parede celular na elevada hidrofobocidade apresentada por esta cepa, indicando a grande possibilidade da existência de glicoprotéinas de caráter hidrofóbico na superfície celular.

É ainda possível que o caráter hidrofóbico apresentado pela cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ se deva a presença de proteínas com resíduos hidrofóbicos, visto que a hidrólise de proteínas reduziu significativamente a hidrofobicidade celular. Embora a hidrólise de polissacarídeos também tenha apresentado o mesmo efeito sobre a hidrofobicidade celular, essa redução pode estar vinculada a desestruturação da parede, pois a função dos polissacarídeos é dar resistência e rigidez a parede celular, por isso, sua hidrólise causou a desorganização observada na Figura V.15(B). Além disso, as proteínas da parede celular se encontram ligadas covalentemente aos polissacarídeos, formando as glicoproteínas. Com isso, a hidrólise dos polissacarídeos acaba por desestruturar as proteínas, alterando assim, a hidrofobicidade.

V.6. Estudo da influência da fonte de carbono na hidrofobicidade celular

A fonte de carbono presente no meio de cultivo infuencia vários fatores como a produção de biossurfactante, a natureza do biossurfactante entre outras coisas. Com o intuito de verificar se a fonte de carbono disponível influenciaria na composição da parede celular, influenciando, assim, na hidrofobicidade celular, cultivou-se *Yarrowia lipolytica* em meio contendo diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol e óleo cru) e mediu-se a hidrofobobicidade celular através do teste MATS. A Tabela V.17 apresenta os resultados obtidos.

Tabela V.17. Hidrofobicidade detectada pelo teste MATS para cepas de *Y. lipolytica* crescendo em meio contendo diferentes fontes de carbono.

	Hidrofobicidade (% Adesão)
Glicose	91,3 ± 1,1
Glicerol	89,4 ± 0,4
Petróleo	88,6 ± 1,3

O teste MATS mostrou que não há diferença na hidrofobicidade celular de *Y. lipolytica* quando se muda a fonte de carbono disponível no meio de cultivo. Porém, mesmo diante desse resultado foi analisada a contribuição das proteínas e dos polissacarídeos na hidrofocidade celular de *Y. lipolytica* crescida em glicerol e em petróleo.

Ao tratar as células crescidas em glicerol e petróleo com pronase houve diminuição gradativa da hidrofobicidade celular atingindo um hidrofobicidade final de aproximadamente 35% e 30% de adesão para células crescidas respectivamente, em glicerol e petróleo, como mostra a Figura V.22.

A Tabela V.18 mostra a quantidade de proteína no sobrenadante da reação enzimática nos dois casos descritos. Em ambos os casos, foi liberada aproximadamente 0,120 mg/mL de proteína no meio reacional, o que resulta em cerca de 0,020 mg de proteína/ mg de células, indicando que ocorreu hidrólise de proteínas presentes na superfície celular.

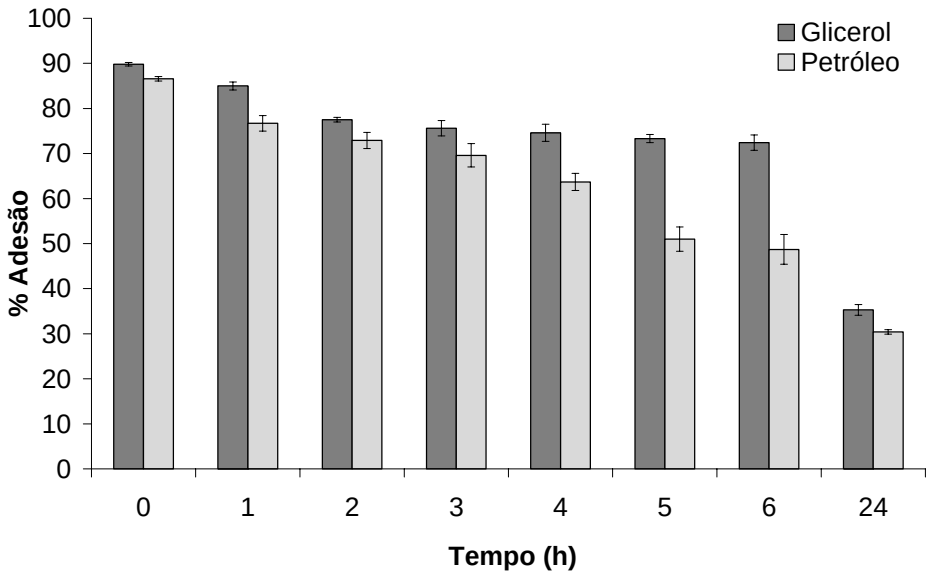

Figura V.22. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio contendo glicerol e em meio contendo petróleo e tratadas com pronase.

Tabela V.18. Quantidade de proteína dada pelo método de Lowry da solução do sobrenadante da reação enzimática com pronase de *Y. lipolytica* cultivadas em meio contendo glicerol e em meio contendo petróleo.

	Concentração de proteína (mg/mL)
Glicerol	0,222
Petróleo	0,218

A Figura V.23 mostra a variação da hidrofobicidade celular durante o tratamento com amiloglicosidase para células de *Y. lipolytica* crescidas em meio contendo glicerol e em meio contendo petróleo. Para as células crescidas em glicerol a redução da hidrofobicidade celular foi pequena, atingindo o valor de aproximadamente 70% de adesão ao final da reação enzimática. Já as células crescidas em petróleo apresentaram uma redução um pouco maior na hidrofobicidade celular quando expostas a hidrólise enzimática com amiloglucosidase, atingindo 60% de adesão ao final da reação.

Apesar da redução na hidrofobicidade de células crescidas em glicerol e petróleo terem sido inferior a redução das células crescidas em glicose quando submetidas ao mesmo tratamento, a glicose livre total gerada na reação foi praticamente igual nos três casos, indicando que a hidrólise ocorreu (Tabela V.19).

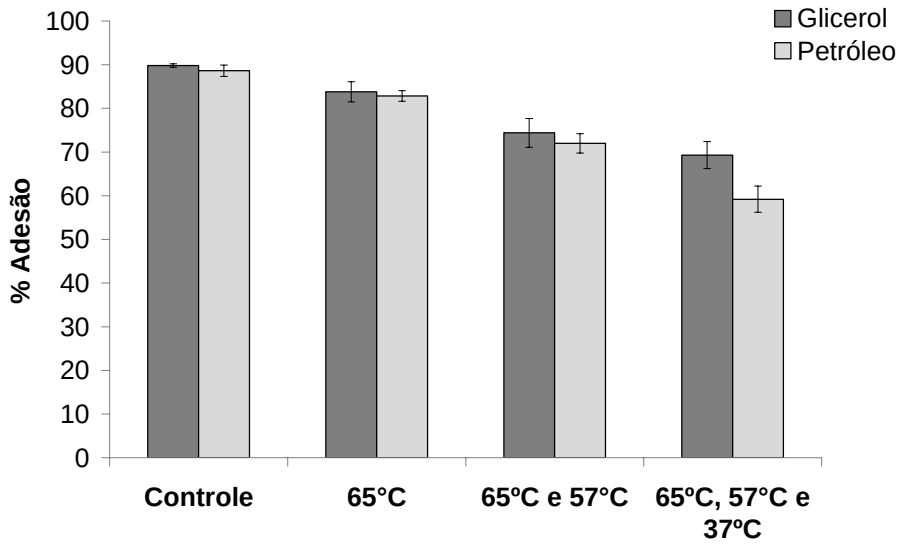

Figura V.23. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio contendo glicerol e em meio contendo petróleo e tratadas com amiloglucosidase.

Tabela V.19. Quantidade de glicose livre dada pelo método da glicose oxidase do sobrenadante da reação enzimática com amiloglucosidase de *Y. lipolytica* cultivadas em meio contendo glicerol e em meio contendo petróleo.

	mg de glicose/mg de células	
	Glicerol	**Petróleo**
65°C/30 min	0,107	0,106
57°C/2h	0,039	0,042
37°C/22h	0,070	0,070

Esses resultados indicam que apesar da fonte de carbono não ter influenciado na hidrofobicidade celular certamente influenciou na composição da parede celular, pois quando as células crescidas em diferentes substratos foram submetidas ao mesmo tratamento enzimático suas superfícies celulares responderam de maneira diferente. A influência da fonte de carbono na composição da parede celular já havia sido verificada em trabalhos anteriores (ANDERSON *et al*., 1990).

Como já descrito anteriormente, as proteínas (15% ± 1%) tem menor participação na composição da parede celular do que os polissacarídeos (70% ± 5%), porém sua hidrólise resultou numa redução bem maior na hidrofobicidade celular, indicando a grande possibilidade das proteínas estarem ligadas diretamente ao elevado caráter hidrofóbico

apresentado pela cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Contudo, a hidrólise de polissacarídeos também afeta a hidrofobicidade celular, pois os polissacarídeos são a matriz da parede celular responsáveis pela rigidez e resistência mecânica desta organela. Além disso, os polissacarídeos encontram-se ligados às proteínas, logo, sua hidrólise afeta indiretamente a estrutura das proteínas, afetando, assim, a hidrofobicidade celular.

A síntese da parede celular é rigorosamente controlada. A composição de polissacarídeos, estrutura e espessura da parede celular variam consideravelmente, dependendo das condições ambientais. Não surpreendentemente, formação da parede celular é estritamente coordenado com o ciclo celular. Por exemplo, a maioria dos genes codificadores de proteínas da parede celular é regulada pelo ciclo celular (KLIS *et al*., 2006).

Além das funções das assembléias de proteínas, funções específicas de diferentes proteínas são importantes. A camada externa de proteína da parede celular é composta por pelo menos 20 diferentes glicoproteínas e a composição desta camada de proteína pode variar dependendo das condições de crescimento. Isto cria a oportunidade para a célula apresentar uma ampla variedade de novas funções. As proteínas da parede celular também podem afetar fortemente a hidrofobicidade das células, o que é importante para a adesão destas (KLIS *et al*., 2006).

As proteínas estão envolvidas na maioria das funções da parede celular (CHAFFIN, 1998). Algumas parecem estar especificamente envolvidas na reparação da parede celular (KLIS *et al*., 2006). Em algumas espécies como *Candida albicans* muitos trabalhos demonstram que as proteínas da parede celular estão diretamente ligadas à capacidade de adesão da célula (DOUGLAS, 1995; FUKAZAWA e KAGAYA, 1997).

VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- ✓ *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 é uma levedura com potencial para aplicação em processos de biorremediação de óleo cru, se mostrando eficiente na degradação de hidrocarbonetos.
- ✓ Os compostos degradados por *Y. lipolytica* incluem n-parafinas, isoprenóides, hidrocarbonetos diaromáticos como o naftaleno, metilnaftalenos, dimetilnaftalenos e trimetilnaftalenos, e hidrocarbonetos triaromáticos como fenantreno, metilfenantreno e trimetilfenantreno.
- ✓ O delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^4 permitiu avaliar o efeito das variáveis temperatura, agitação, concentração de inóculo e concentração inicial de petróleo sobre a remoção de óleo cru. Todas as variáveis apresentaram influência significativa sobre a remoção de óleo, sendo que as variáveis temperatura, agitação e concentração de inóculo apresentaram influência positiva e a concentração inicial de petróleo apresentou influência negativa.
- ✓ Dentre as condições estudadas para o processo de biorremediação as melhores condições de temperatura e agitação foram 28°C e 250 rpm. Porém, não podemos dizer que estas são as condições otimizadas, pois não foi realizado nenhum experimento com a agitação acima de 250 rpm para verificar se melhoraria ainda mais a remoção ou esta agitação é realmente a condição ótima para o processo.
- ✓ O planejamento fatorial completo 2^4 permitiu avaliar também a influência dessas variáveis sobre a produção de biossurfactante. Todas variáveis apresentaram influência positiva significativa sobre a produção de biossurfactante.
- ✓ *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 foi capaz de crescer em meio contendo somente glicerol como única fonte de carbono. Além disso, crescendo em meio contendo glicerol e óleo cru foi capaz de consumir os dois substratos simultaneamente.

- ✓ A fonte de carbono utilizada influenciou na produção do biossurfactante. A glicose e o glicerol, fontes de carbono solúveis, não favoreceram a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica*. Contudo, a presença de substrato hidrofóbico como o óleo cru estimulou a produção e excreção de biossurfactante.
- ✓ *Y. lipolytica* parece utilizar os dois mecanismos possíveis de acesso a substratos hidrofóbicos: adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular e absorção mediada por um surfactante.
- ✓ A adsorção direta dos substratos hidrofóbicos é possível devido ao elevado caráter hidrofóbico apresentado pela superfície celular desta cepa. Esse caráter hidrofóbico possivelmente se deve as glicoproteínas presentes na parede celular. Contudo, as proteínas parecem estar mais diretamente ligadas ao fenômeno da hidrofobicidade celular.
- ✓ A hidrofobicidade celular apresentada por *Y. lipolytica* não foi influenciada pela fonte de carbono. Contudo, a fonte de carbono parece influenciar a composição da parede celular e, portanto, influencia os componentes responsáveis pela hidrofobicidade celular.

VII. SUGESTÕES

- ✓ Otimizar as condições de biorremediação de óleo cru por *Y. lipolytica*, utilizando condições acima de 250 rpm.
- ✓ Utilizar a técnica de bioestimulação, que consiste na correção adequada das condições ambientais como pH e nutrientes para estimular ainda mais a biodegradação de hidrocarbonetos por *Y. lipolytica*.
- ✓ Estudar a relação C/N que melhor propicia a biorremediação de óleo cru.
- ✓ Realizar experimentos mais longos para investigar melhor o potencial biodegradador da cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, ou seja, verificar quais grupos de hidrocarbonetos presentes no óleo cru são parcialmente e/ou totalmente degradados. Além disso, as amostras de óleo cru remanescente do processo de biorremediação podem ser concentradas em rotaevaporador para melhor analisar os compostos residuais.
- ✓ Utilizar uma metodologia melhor para análise de óleo total.
- ✓ Realizar a hidrólise de proteínas seguida da hidrólise de polissacarídeos na parede celular de *Y. lipolytica* a fim de comprovar o envolvimento direto das proteínas.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMASSU, W.; KORUS, R. A. Engineering of bioremediation processes: needs and limitations. In: Bioremediation: Principles and Applications – Biotechnology Research Series: 6. Crawford, R.; Crawford, D. (Editors), Cambridge University Press. pp. 13-34, 1996.

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. Biotechnology letters, v. 22, pp. 313-316, 2000.

AGUEDO, M.; WACHÉ, Y.; COSTE, F.; HUSSON, F. e BELIN, J.-M. Impact of surfactants on the biotransformation of methyl ricionoleate into γ-decalactone by *Yarrowia lipolytica*. Journal of molecular catalysis b: enzymatic, v. 29, pp. 31-36, 2004.

ALBUQUERQUE, C. D.C.; FILETE, A. M. F.e CAMPOS-TAKAKI, G.M. Ampliação de escala e estudo dos efeitos da agitação e da temperatura no processo de produção de bioemulsificante por *Candida lipolytica*. Trabalho completo do X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, Goiânia, 2006.

AMARAL, P. F. F. produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Dissertação (Doutorado em Ciências), EQ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2007

AMARAL, P. F. F.; SILVA, J. M.; LEHOCKY, B. M.; BARROS-TIMMONS A. M. V.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M. e COUTINHO, J. A. P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. Process Biochemistry, v. 41, pp. 1894–1898, 2006.

ANDERSON, J.; MIHALIK, R. e SOLL D. R. Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. J. Bacteriol., v. 172, pp. 224-235, 1990.

ATLAS, R.M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: and Environmental Perspective. Microbiological Reviews, v. 45(1), pp. 180-209, 1981.

AZEVEDO, D. A., Análise de hidrocarbonetos de Tasmanitas e Síntese de Terpano Tricíclico C_{20} Desmetilado em C_8. Dissertação (Mestrado em Ciências) – IQ – Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1990.

BARTH, G. e GAILLARD, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Reviews, v. 19, pp. 219-237, 1997.

BELLON-FONTAINE, M.-N.; RAULT, J. e VAN OSS, C.J. (1996), "Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis

acid-base properties of microbial cells", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 71, pp. 147-153.

CASAS, J. e GARCIA-OCHOA, F. G .Sophorolipid Production by *Candida bombicola*: Medium Composition and Culture Methods. Journal of bioscience and bioengineering, v. 88(5), pp. 488-494, 1999.

CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S. e PERREIRA, D.C. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo. Ciência Hoje, v. 30, p. 32-37, 2002.

CARDOSO, A. M. Sistema de informaçãoes para planejamento e resposta a incidentes de poluição marítima por derramamento de petróleo e derivados. Dissertação (Mestrado em Ciências), COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

CHAFFIN, W.L.; PEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D. e MARTI´NEZ, J. P. Cell Wall and Secreted Proteins of Candida albicans: Identification, Function, and Expression. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 62(1), pp. 130-180, 1998.

CHALLIN, F.; FLECHE, A. L.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y.; GRIMONT, P.; SALIOT, A. e OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Research in Microbiology v. 155, pp. 587–595, 2004.

CIRIGLIANO, M. C. e CARMAN, G M. Isolation of bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology, v. 48(4), pp. 747-750, 1984.

CIRIGLIANO, M. C. e CARMAN, G M. Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology, v. 50, pp. 846-850, 1985.

DEL´ ARCO, J. P. e FRANÇA, F. P. Influence of oil contamination levels on hydrocarbons biodegradation in Sandy sediment. Environmental Pollution, v. 112(3), pp. 515-519, 2001.

DESAI, J. D. e BANAT, I. N. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. Microbiology and molecular biology reviews, v. 61(1), pp. 47–64, 1997.

DESPHANDE, M. e DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by Candida bombicola using animal fat. Bioresource Technology, v. 54, pp. 143-150, 1995.

DOUGLAS, L. J. Adhesin-receptor interactions in the attachment of *Candida albicans* to host epithelial cells. Can. J. Bot., v. 73(1), pp. 1147-1153, 1995.

DUJON, E.P. Genome evolution in yeast. Nature, v. 430, pp. 35-43, 2004.

FARKAS, V. Biosynthesis of cell walls of fungi. Microbiol. Mol. Biol. Rev., v. 43(2), pp. 117-144, 1979.

FELICE B.D.; PONTECORVO G. e CARGAGNA M. Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and Pseudomonas putida. Acta Biotechnologica, v. 17(3), pp. 231 – 239, 2004.

FERRÃO, C. M. Derramamento de óleo no mar por navio petroleiro. Trabalho de conclusão de curso (Pós-graduação executiva em meio ambiente), COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

FERREIRA, T.F.; COELHO, M.A.Z. e ROCHA-LEÃO, M.H.M. Obtenção de β-glucana parcialmente degradada em células de *Saccharomyces cerevisiae* permeabilizadas e livres de glicogênio. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife, Brasil (2005).

FICKERS, P.; BENETTI P. H.; WACHE, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S.; SMIT, M.S. e NICAUD, J. M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Research, v. 5, pp. 527–543, 2005.

FONTES, G. C. Produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica.* Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (2008).

FUKAZAWA, Y. e KAGAYA, K. Molecular basis of adhesion of *Candida albicans.* J. Med. Vet. Mycol., v. 35, pp. 87–99, 1997.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASA, A. e GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. Biotechnology Advances, v. 18, p. 549-579, 2000.

GRISCHENKOV, V. G.; TOWNSEND, R. T.; McDONALD, T. J.; AUTENRIETH, R. L.; BONNER, J. S. e BORONIN, A. M. Degradação of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. Process Biochemistry, v. 35(9), pp. 889-896, 2000.

HAEGLER, A.N. e MENDONÇA-HAEGLER, L.C. Yeast from marine and astuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil, Appl. Environ. Microbiol., v. 41(1), pp.173-178, 1981.

HEAD, I.M. e SWANNELL, R. P. J. Biorremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. Current Opinion in Biotechnology, v. 10, pp. 234-239, 1999.

HOMMEL, R.K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RIKE, O. e KLEBER, H.P. Production of sophorose lipid by *Candida* (*Torulopsis*) apicola grown on glucose. Journal of Biotechnology, v. 33(15), pp. 147-155, 1994.

HUNT, J. M. Petroleum Geochemistry and Geology 2nd edition, W. H. Freeman and Company, 744p. – New York, 1995.

IJAH U.J.J. Studies on relatives capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. Waste Management, v. 18, pp. 293-299, 1998.

ISMAIL, S. A. S.; DEAK, T.; EL-RAHMAN, H. A. ABD.; YASSIEN, M. A. M. e BEUCHAT, L. R. Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. International Journal of Food Microbiology, v. 64(28), pp. 13-19, 2001.

KAMZOLOVA, S.V.; MORGUNOV, I.G.; ANDREAS, A.; PEREVOZNIKOVA, O.A.; SHISHKANOVA, N.V.; STOTTMEISTER, U. e FINOGENOVA, T.V. Lipase Secretion and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast Grown on Animal and Vegetable Fat. Food Technol. Biotechnol., v. 43(2), pp. 113–122, 2005.

KILLOPS, S. e KILLOPS V., Introduction to Organic Geochemistry – 2nd edition – Blackwell Publishing, 2005.

KIM, H. S.; JEON, J. W .; KIM, B. H.; AHN, C. Y.; MOCK OH, H. e YOON, B. D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by Candida sp. SY16 using fed-batch fermentation. Applied Microbiol Biotechnology, v. 70, pp. 391-396, 2006.

KIM, T.H.; OH, Y.-S. e KIM, S.J. The possible involvement of the cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil degrading yeast *Yarrowia lipolytica* 180. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 10, pp. 333–337, 2000.

KIM, H. S.; YOON, B. D.; CHOUNG, D. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T e TANI, Y. Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 52, pp. 713-721, 1999.

KIM, S. Y.; OH, D. K.; LEE, K. H. e KIM, J. H. Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. Applied Microbiology Biotechnology, v. 48, pp. 23-26, 1997.

KIM T.H.; LEE J.H.; OH Y.S.; BAE K.S. e KIM S.J. Identification and Characterization of an Oil-degrading Yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. The Journal of Microbiology, v.37(3), pp. 128-135, 1999.

KIM, Y. B. e REHM, H. J. Studies on a mixed culture of *Candida parapsilosis* and different bacilli on alkane. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 14(12), pp. 112-119, 1982.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A. e DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, v. 23, pp. 185-202, 2006.

KOMAGATA K.; NAKASE T. e KATSUYA N., Assimilation of hydrocarbons by yeast. I.Preliminary screening. J. Gen. Appl. Microbiol., v. 10, pp. 313-321, 1964.

LEAHY, J.G. e COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. Microvbiological Reviews,v. 54(3), pp. 305-315, 1990.

LOBÃO, M. M.. Identifcação de derrames de óleo no mar: um estudo de casos. Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. e RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biol. Chem., v. 193, p. 265-275.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Oil in the sea III: Inputs, Fates and Effects – The National Academies Press, 2003.

NICAUD, J-M.; FABRE, E. e GAILLARDIN, C. Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. Curr. Genet., v. 16, pp.253-260, 1989.

NICAUD, J-M.; MADZAK, C.; BROEK, P.V.D; GYSLER, C.; DUBOC, P.; NIEDERBERGER, P. e GAILLARDIN, C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*, FEMS Yeast Research, v. 2(3), pp.371-379, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; KOMAITIS, M.; MARC, I. e AGGELIS, G. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 58, pp. 308-312, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G. e MARC, I. Accumulation of a Cocoa-Butter-Like Lipid by *Yarrowia lipolytica* Cultivated on Agro-Industrial Residues. Current Microbiology, v. 46, pp. 124-130, 2003.

PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: Formation of a biosurfactant; Effects on respiratory activity and growth. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 8, n. 1-2, 1979.

PETERS, K. E.; WALTERS, C. C. e MOLDOWAN, J. M. The Biomarker Guide – 2nd edition – Cambridge University Press, Cambridge – UK, 2005.

PETROBRAS. Disponível em <http://www2.petrobras.com.br/portal/petrobras.htm>. Acesso em: 30 de abril de 2009.

Resolução CONAMA número 269, de 14 de setembro de 2000. Disponível em: http://www.mma.gov.br/conama.

RON, E. e ROSENBERG, E. Natural roles biossurfactants. Enviromental Microbiology, v. 3, pp. 229-236, 2001.

RON, E. Z. e ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. Current Opinion in Biotechnology, v.13, pp.249-252, 2002.

ROSENBERG, E.; LEGMANN, R.; KUSHMARO, A.; ADLER E.; ABIR H. e RON, ELIORA Z. Oil bioremediation using insoluble nitrogen source. Journal of Biotechnology. v. 51, pp. 273-278, 1996.

ROSENBERG, E. e RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied Microbiol Biotechnology, v. 52, pp. 154-162, 1999.

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C.; NEVES, M. L. C.; SILVA, M. P.; PORTO, A. L. F. e CAMPOS-TAKAKI, G. M. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 95, 2001.

SARUBBO, L. A.; FARIAS, C.B.B. e CAMPOS-TAKAKI, G. M. Co-Utilization of Canola Oil and Glucose on the Production of a Surfactant by *Candida lipolytica*, Current Microbiology, v. 54(1), pp. 68-73, 2007.

SCHMIDELL, W. Em Biotecnologia Industrial; eds.; Edgard blucher LTDA: Brasil 2001, cap 14.

SCIOLI, C. e VOLLARO, L. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. Water Research, v. 31(10), pp. 2520-2524, 1997.

SOUZA, E. S. e TRIGÜIS, J. A.. Degradação do petróleo em derrames no mar – Intemperismo X Biorremediação. 3° Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, Salvador, 2005.

SOUZA FILHO, A. M.. Planos Nacionais de Contingência para atendimento a derramamento de óleo: análise de países representativos das Américas para implantação no caso do Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências), COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

TAMANQUEIRA, J.B. Caracterização de diamantóides em amostras de óleos da bacia sedimentar brasileira. Dissertação (Mestrado em Ciências), COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

THOMAS, J. E. (organizador). Fundamentos da Engenharia de Petróleo. Rio de Janeiro, Interciência, 2001.

TISSOT, B. P. e WELTE, D. H. Petroleum Formation and Occurrence – A New Approach to Oil and Gas Exploration 2nd edition, Springer-Verlag, 699p. – Berlin Heidelberg, 1984.

TSUGAWA, R.; NAKASE, T.; KOYABASHI, T.; YAMASHITA, K. e OKUMURA, S. Fermentation of n-parafins by yeast. Part III. K-Ketoglutarate productivity of various yeast. Agricultural of Biology and Chemistry, v. 33, pp. 929 - 938, 1969.

VALLE, M. L. M. Produtos do setor de combustíveis e de lubrificantes. Rio de Janeiro, Publit, 2007.

VASDINYEI, R. e DEAK, T. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. International Journal of Food Microbiology, v. 86, pp. 123– 130, 2003.

VEGA, R. e DOMINGUÉZ, A. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Yarrowia lipolytica*. Archives of Microbiology, v. 144(2), pp. 124-130, 1986.

WEBER, L.; DOGE, C. e HAUFE, G. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis apicola*. Biocatalysis, v. 5, pp. 267-272, 1992.

WENGER, L. M. e ISAKSEN, G. H. Control of hydrocarbon seepage intensity on level of biodegradation in sea bottom sediments. Organic Geochemistry, v. 33, pp. 1277-1292, 2002.

WIEDMANN, L.S.M. Caracterização geoquímica de óleos da bacia sedimentar brasileira. Dissertação (Doutorado em Ciências), COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

ZINJARDE, S. S. e PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. Journal of Basic Microbiology, v. 42, pp. 67–73, 2002.