UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Bioquímicos

IMOBILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO EM DIFERENTES MATRIZES POLIMÉRICAS PARA USO NA BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO.

Autor: Everton Amazonas dos Reis

Rio de Janeiro

2015

EVERTON AMAZONAS DOS REIS

IMOBILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO EM DIFERENTES MATRIZES POLIMÉRICAS PARA USO NA BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO.

Orientadora: Profª Drª Selma Gomes Ferreira Leite

Co-Orientadora: Profª Drª Maria Helena Miguez Rocha-Leão

EQ/UFRJ

EVERTON AMAZONAS DOS REIS

IMOBILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO EM DIFERENTES MATRIZES POLIMÉRICAS PARA USO NA BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO.

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

ESCOLA DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Reis, Everton Amazonas dos

Imobilização de nitrogênio e fósforo em diferentes matrizes poliméricas para uso na biorremediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo. / Everton amazonas dos Reis. - 2015.

XVII, 77 f.; il.

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2015

Orientadoras: Selma Gomes Ferreira Leite e Maria Helena Miguez Rocha-Leão

1.Polímeros. 2. Encapsulamento. 3.Planejamento de experimento. 4.nitrogênio. 5.Fósforo. 6. Bioestímulo. 7. Bioremediação – Teses. I. Leite, Selma Gomes Ferreira (Orient.). II Rocha-Leão, Maria Helena Miguez (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título.

EVERTON AMAZONAS DOS REIS

IMOBILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO EM DIFERENTES MATRIZES POLIMÉRICAS PARA USO NA BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO.

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientadores:

Profª Dr.ª Selma Gomes Ferreira Leite – EQ/UFRJ

Profª Dr.ª Maria Helena Rocha-Leão – EQ/UFRJ

Banca examinadora:

Profª Drª Eliana Flávia C. Sérvulo EQ/UFRJ

Profª Drª Melissa Limoeiro E. Gutarra EQ/UFRJ

Flávia Lima do Carmo

Profª Drª Flávia Lima do Carmo UFRJ/ IMPG

Dr. Rodrigo Gouvea Taketani EMBRAPA

Drª Cláudia Duarte da Cunha CETEM

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2015

Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa. -
Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Dedico a cinco pessoas que nessa caminhada sempre estiveram ao meu lado, apoiando, dando força, esperança e sabedoria para enfrentar cada obstáculo imposto pela vida. São elas:

Meu pai Nicolau, que me ensinou o significado de ser homem honrado, chefe de família e exemplo de pessoa de bem.

Minha Mãe Dalva, por toda doçura dedicada à minha criação e educação.

Minha sogra Lina, por me ensinar a nunca desistir, independente da dificuldade enfrentada.

Minha esposa Milaine, pelo companheirismo em todos os momentos da vida, paciência nos momentos mais difíceis na elaboração desta tese e acima de tudo ter me proporcionado o melhor sentimento que um homem pode ter: ser pai.

Minha filha Camylle, que tão novinha me mostrou que na vida, as melhores vitórias são oriundas dos maiores sacrifícios. Obrigado por me fazer o papai mais feliz do mundo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser minha luz e me ampara todas as vezes que pensei não suportar as adversidades da vida, no íntimo do meu coração, sempre me lembrou que nunca estive sozinho. Obrigado meu Senhor !!

Às minhas orientadoras, Profª Dra Selma Gomes Ferreira Leite e Profª Dra Maria Helena Miguez Rocha-Leão, pela orientação durante o desenvolvimento desta tese, pela confiança, apoio e amizade.

Aos meus amigos do laboratório 113, Profª Dra Melissa, Manoela, Dra Joyce, Douglas, Tayrini, Bárbara, Yago, Emelay, Thalita, Érica, Cristiane, pela harmoniosa convivência no laboratório, pelo apoio que sempre me deram, compartilhando as alegrias e os estresses. Saibam que nossa amizade será para vida toda.

A Profª Dra Magali Camarota, Profª Dra Eliana Flávia e Profª Dra Francisca Pessoa, que contribuíram para realização deste trabalho.

Aos amigos integrantes do laboratório LEMM, Dra Flávia Lima do Carmo, Dr. Henrique fragoso, Hugo, Edir, Dra Raquel Peixoto e em especial ao Profº Dr. Alexandre Rosado, por deixar as portas do seu laboratório sempre abertas para qualquer ajuda necessária.

Ao CETEM, pela disponibilidade de sua infraestrutura na análise de HTP, à Dr. Andrea Rizzo, Daniele e em especial à Dra. Cláudia Duarte da Cunha, grande amiga e incentivadora em todas as horas.

ÍNDICES DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema de um Fertilizante de Liberação Lenta.....**17**

Figura 2: Ilustração esquemática de microcápsulas e microesferas.....**19**

Figura 3: Estrutura química de ácidos algínicos: a) ácido manurônico, b) ácido gulurônico.....**21**

Figura 4: Estrutura Egg Box do alginato de cálcio.....**22**

Figura 5: reação de obtenção do octenilsuccinato anidro.....**23**

Figura 6: Poli α-(1→4) (ácido D-galacturónico) parcialmente esterificado com grupos metilo (também designado por Poli α-(1→4) (metil galacturonato).....**25**

Figura 7: Molécula da Carboximetilcelulose.....**27**

Figura 8: Dinâmica da PCR. Esquema representativo do princípio da reação da polimerase em cadeias (PCR).....**29**

Figura 9: Esquemas do comportamento das bandas de DNA no gel de agarose e DGGE.....**30**

Figuras 10a,b : Ilustração dos processos de obtenção de encapsulados por métodos de gelificação iônica (a) e por liofilização(b).....**32**

Figura 11: Esquema de organização experimental da 1ª etapa.....**33**

Figura 12: Localização da área de coleta de amostras para realização do experimento de bioestímulo em microcosmo.....**38**

Figura 13: Ilustração da montagem do experimento da etapa final.....**39**

Figura 14: Aparelho TOG/HTP Analyser, usado para quantificar Hidrocarbonetos Totais do Petróleo.....**40**

Figura 15: Ilustração das esferas de alginato/capsul® com N e P imobilizados, obtidas antes e após secagem, pela técnica de gelificação iônica.....**43**

Figura 16: Ilustração da matriz de carboximetilcelulose com imobilizado de nitrogênio e fósforo, obtidos antes e após a fragmentação da matriz, com auxílio da técnica de liofilização.....**44**

Figura 17: Análise de nitrogênio total liberados em sistema líquido durante 51 dias de experimento analisado.....**45**

Figura 18: Análise da concentração de fósforo liberado em sistema líquido durante 51 dias de experimento.....**46**

Figura 19: Avaliação de proteína total em sistemas com nutrientes livres e encapsulados em meio mineral na presença de *Pseudomonas sp*.....**50**

Figura 20: Gráfico de Pareto, gerado pelo *Software Statística 7.0*.....**55**

Figura 21: Gráfico de superfície de resposta.....**56**

Figura 22: Porcentagem de remoção de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo.....**60**

Figura 23: Dendograma do gel de DGGE para o gene que codifica o rRNA 16 S do domínio Bactéria, do experimento de microcosmo nos tempos 0, 15 e 30 dias.....**62**

Figura 24: Dendograma do Gel de DGGE dos experimentos de microcosmo em 30 dias.....**63**

ÍNDICES DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos do derrame de petróleo em ambiente marinho sobre as comunidades biológicas.....**11**

Tabela 2: Composição do meio mineral modificado.....**34**

Tabela 3: Composição do meio mineral Bushnell-Hass.....**35**

Tabela 4: Matriz escalonada da otimização do produtode liberação lenta construída no *software Statístic 7.0*.....**36**

Tabela 5: Massa total dos sais utilizados em cada experimento nas cápsulas de liberação lenta.....**37**

Tabela 6: Concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR – 16S (U968-L1401).....**41**

Tabela 7: Concentração de nitrogênio amoniacal, fósforo total e glicose ao longo das 96h de experimento.....**48**

Tabela 8: Matriz do Planejamento Fatorial Completo (2^2) com réplica de ponto central dos testes de biodegradação em microcosmos, gerada pelo *software statística 7.0*.....**53**

Tabela 9: Análise de Variância (ANOVA) gerada pelo *Software Statística 7.0*.....**54**

Tabela 10: Análise das concentrações de nitrogênios totais, fósforos totais e proteínas totais ao longo de 30 dias de experimento em microcosmo.....**57**

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C –Carbono

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CMC - Carboximetilcelulose

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DGGE – Eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes

DNA – ácido desoxirribonucleico

FDA - Food and Drug Administration

GE – Grau de Esterificação

GA – Grau de Amidação

HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

mg – miligrama

mM – milimolar

N- Nitrogênio

OGMs – Organismos Geneticamente modificados

P –Fósforo

PCR – Reação da Polimerase em Cadeia

Ph – Potencial hidrogeniônicos

ppm - partes por milhão

RNA – ácido ribonucléico

rRNA- RNA ribossômico

TRANSPETRO – Petrobras Transporte S.A

USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos EUA

RESUMO

REIS, Everton Amazonas dos**. Imobilização de nitrogênio e fósforo em diferentes matrizes poliméricas para uso na biorremediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo.** Rio de Janeiro, 2015. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A preocupação com a qualidade ambiental vem aumentando na sociedade, pois o desenvolvimento industrial e tecnológico tem levado a grandes taxas de liberação de contaminantes no ambiente, como por exemplo, hidrocarbonetos. Uma das técnicas mais utilizadas para a biorremediação é o bioestímulo, podendo ser auxiliado através do uso de nutrientes microencapsulados. Diversos estudos vêm avaliando a utilização de fertilizantes de liberação lenta, como uma forma de bioestímulo, para fornecer as concentrações de nutrientes necessárias ao processo de biorremediação. Com o propósito de monitorar a eficiência do tratamento selecionado muitos autores tem feito uso das técnicas moleculares que permitem analisar a estrutura da comunidade dominante de um ambiente natural após a interferência de fatores ambientais e/ou da presença de um poluente. Este trabalho tem por objetivo imobilizar nitrogênio e fósforo em diferentes matrizes poliméricas, criando produtos de liberação lenta e verificando sua viabilidade quanto ao uso no bioestímulo para microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo em ambientes marinhos. Foram feitas imobilizações de nitrogênio e fósforo, utilizando técnicas de liofilização e gelificação iônica em diferentes matrizes poliméricas. Os experimentos conduzidos com o material encapsulado foram comparados ao produto comercial Osmocote® e avaliados quanto a produção de biomassa, consumo de carbono e disponibilização residual de N e P no sistema estudado. O imobilizado composto por alginato/capsul® foi selecionado e após ser otimizado através de planejamento experimental do tipo fatorial, foi possível obter-se a condição de imobilização que permitiu melhor biodegradação com a utilização de N e P na relação 15:10. Esse produto ao ser empregado num experimento em microcosmo contendo água marinha e 0,2% de óleo combustível MF-380 permitiu a remoção de 62% de TPH (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo). O produto comercial Osmocote® removeu 53,5% de TPH o que demonstra a potencial aplicação da matriz polimérica produzida neste trabalho como ferramenta ao bioestímulo em sistema marinho para conduzir a biorremediação.

ABSTRACT

REIS, Everton Amazonas dos**. Immobilization of nitrogen and phosphorus in different matrixes polymers for use in marine environments bioremediation contaminated by petroleum hydrocarbons.** Rio de Janeiro, 2015. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The concern for environmental quality is increasing in society, for the industrial and technological development has led to major contaminant release rates in the environment, such as hydrocarbons. One of the most widely used techniques for bioremediation is biostimulation and may be aided by nutrient microencapsulation. Several studies have evaluated the use of slow-release fertilizers, as a form of biostimulation to provide concentrations of nutrients required for the bioremediation process. With the purpose of monitoring the effectiveness of treatment selected many authors have made use of molecular technique to analyze the structure of a natural dominant community environment after the interference of environmental factors and / or the presence of a pollutant. This study aims to immobilize nitrogen and phosphorus in different polymer matrices, creating products of slow release and verifying its feasibility for the use in biostimulation for degrading microorganisms of petroleum hydrocarbons in marine environments. Nitrogen and phosphorus assets were made using freeze-drying techniques and ionic gelation in different polymeric matrices. The experiments conducted with the encapsulated material were compared to the commercial product Osmocote® and evaluated for biomass production, carbon consumption and residual availability of N and P in the system studied. The property consists of alginate / capsul® was selected and after being optimized using a factorial experimental design, it was possible to obtain the condition of detention which improved biodegradation with the use of N and P in relation 15:10. This product to be used in an experiment in microcosm containing sea water and 0.2% MF-380 fuel oil allowed the removal of 62% of TPH (Total Petroleum Hydrocarbons). The commercial product Osmocote® removed 53.5% TPH demonstrating the potential use of the polymeric matrix produced in this work as a tool in the biostimulation marine drive system for bioremediation.

SUMÁRIO

Capítulo 1 1

INTRODUÇÃO 1

Capítulo 2 4

JUSTIFICATIVA 4

Capítulo 3 6

OBJETIVOS GERAL 6

3.1. Objetivo Geral 6

3.2. Objetivos Específicos 6

Capítulo 4 7

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7

4.1. Petróleo 7

4.1.1. Formação e Composição 7

4.1.2. Transporte de hidrocarbonetos e derramamentos marinhos 8

4.1.3 Impactos ambientais do petróleo 9

4.1.4 Efeitos prejudiciais às atividades socioeconômicas e à saúde humana 12

4.1.5 Tratamentos de áreas contaminadas com derivados de petróleo 12

4.2. Biorremediação 13

4.2.1. Aspectos Gerais 13

4.2.2 Fatores que afetam o processo de biorremediação 14

4.2.2.1 Temperatura 14

4.2.2.2 Concentração de oxigênio 14

4.2.2.3 pH 14

4.2.2.4 Nutrientes 15

4.2.3 Técnicas de Biorremediação 15

4.2.3.1. Bioaumento e/ou Bioenriquecimento 15

4.2.3.2 Bioestímulo 16

4.3. Encapsulamento “Estado da Arte” 18

4.3.1 Histórico 18

4.3.2 Definição 18

4.3.3 Micropartículas: Microesferas e Microcápsulas 19

4.3.4 Matriz de revestimento 20

4.3.4.1 Alginato 20

4.3.4.2 Capsul® 23

4.3.4.3 Pectina 24

4.3.4.4 Carboximetilcelulose 26

4.4. Ecologia Microbiana Molecular. 28

4.4.1 Extração de ácidos nucléicos a partir de amostras ambientais 28

4.4.2 DGGE(Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturantes) 30

Capítulo 5 32

MATERIAIS E MÉTODOS 32

5.1 PRIMEIRA ETAPA: Obtenção dos Encapsulados. 32

5.1.1 Materiais usados na 1ª etapa. 32

5.1.2 Elaboração do produto de liberação lenta. 33

5.1.3 Estudo cinético de liberação dos nutrientes 33

5.1.4 Determinações Analíticas 34

5.2 SEGUNDA ETAPA: Avaliação do processo de bioestímulo utilizando os encapsulados. ... 34

5.3 TERCEIRA ETAPA 35

5.3.1 Determinação da melhor relação de nitrogênio e fósforo e aplicação do produto de liberação lenta em microcosmo 35

5.3.2 Determinações analíticas da etapa final 39

5.3.2.1 Dos nutrientes 39

5.3.2.2 Os hidrocarbonetos 39

5.3.3 Da diversidade microbiana 40

5.3.3.1 Extração de DNA dos sistemas de tratamento 40

5.3.3.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)..... 41

5.3.3.3 DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes) 41

Capítulo 6 43

RESULTADOS E DISCUSSÕES. 43

6.1 Obtenção dos Encapsulados de Nitrogênio e Fósforo – Primeira Etapa. 43

6.1.1 Aspectos estruturais dos encapsulados 43

6.1.2 Perfil de liberação de nitrogênio imobilizado em diferentes matrizes. 44

6.1.3 Perfil de liberação de fósforo imobilizado em diferentes matrizes. 46

6.2 Segunda Etapa - Avaliação do processo de bioestimulação dos imobilizados 48

6.3 Terceira Etapa – Determinação da melhor relação N e P e aplicação do encapsulado de liberação lenta..... 52

6.4 Análises completas da biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo nos sistemas estudados 56

6.5 PCR-DGGE..... 61

Capítulo 7 64

CONCLUSÕES.....64

Capítulo 8 66

PERSPECTIVAS.....66

Capítulo 9 67

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A preocupação com a qualidade ambiental vem se tornando cada vez mais presente na sociedade, em função da maior percepção de que os recursos naturais estão cada vez mais escassos, e de que o desenvolvimento acelerado tem criado problemas constantes de poluição.

A atividade industrial é um dos principais responsáveis pela degradação ambiental, por meio de emissões gasosas não controladas e disponibilização inadequada de rejeitos tóxicos que contaminam o meio ambiente (BRITO et al., 2004).

As preocupações ambientais, incipientes até a ocorrência da 2ª Guerra Mundial, demonstraram ser de vital importância na medida em que mais e mais acidentes ambientais passaram a ocorrer, estimulando a pesquisa de forma a reparar ou minimizar, nos processos produtivos, esses danos ambientais. Além disso, a pressão por parte dos governos e da opinião pública tem forçado essa postura ambientalmente correta das indústrias, estabelecendo leis que regulem o gerenciamento ambiental (BAYARDINO, 2004; MARTINS et al, 2003, MOLINA-BARAHONA et al, 2005).

Nesse contexto, encontram-se as indústrias de petróleo que são potencialmente grandes causadoras de impactos ambientais, inerentes ao seu processo produtivo. Tais impactos vêm do consumo de grandes quantidades de água e energia, da produção de efluentes e resíduos sólidos de difícil tratamento e disposição, e da liberação de gases tóxicos na atmosfera (MARIANO, 2005).

As refinarias de petróleo geram uma grande quantidade de derivados indesejáveis que são os principais poluidores do solo e mananciais de água. As fontes destes produtos são provenientes principalmente dos fundos de tanques-reservatórios e das unidades de tratamento. No Brasil, as regiões costeiras estão mais suscetíveis a derramamentos de petróleo e seus derivados uma vez que são nas operações realizadas nos portos e terminais que têm sido registrados os maiores índices de acidentes, cerca de 90,8% do total (SILVA, 2004).

Um derrame de óleo pode gerar uma série de impactos sobre os organismos e os ecossistemas, prejudicando atividades recreativas como banho de mar, mergulho, pescaria,

além de gerar contestação por parte da população, comércio (hotéis, restaurantes, turismo), governo local, indústrias que usam recursos do mar e outros setores da sociedade que se utilizam desse ambiente (KHANNA & BARUA, 2001; SOUZA et al, 2010). Por outro lado, é extensa e fundamental a importância do petróleo em nossa sociedade, tal como está atualmente organizada. O petróleo não é apenas uma das principais fontes de energia utilizadas, mas também seus derivados são matérias-primas para a manufatura de inúmeros bens de consumo e, deste modo, tem um papel cada dia mais presente e relevante na sociedade (MARIANO, 2005).

A contaminação ambiental por petróleo e seus derivados tem sido um dos principais problemas das últimas décadas, tendo em vista a complexidade desses compostos e a dificuldade de remediação dos mesmos representando assim grandes riscos aos ecossistemas aquáticos e terrestres. (WETLER-TONINI et al, 2010; FRANCO et al, 2004).

Atualmente, esforços estão sendo feitos no desenvolvimento de novas alternativas de remediação desses ambientes contaminados por petróleo. Isto se deve ao fato das tecnologias de tratamento tradicionais, tais como contenção e recolhimento através de barreiras flutuantes, adsorção por materiais naturais ou sintéticos, entre outros, não serem direcionados à degradação do petróleo (NIKOLOPOULOU & KALOGERAKIS, 2009). Diante da dificuldade de se tratar áreas contaminadas com petróleo, pode ser exigida a utilização de uma combinação de tecnologias biológicas, físicas e químicas para reduzir a contaminação a um nível seguro e aceitável (THAVASI et al, 2011).

Os processos biológicos, quando comparados aos processos físico-químicos, são considerados mais seguros e com custo relativamente baixo. O aumento das pesquisas nessa área se deve a menor agressão que o tratamento biológico provoca ao meio ambiente, já que, muitas vezes, faz uso de processos naturalmente existentes, gerando assim melhor aceitação pela opinião pública, por ser considerada uma “forma natural” de tratamento. (BRITO et al, 2004; THAVASI et al, 2011).

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza o estímulo da atividade microbiana para degradar compostos orgânicos, em especial hidrocarbonetos de petróleo, resultando na transformação em metabólitos ou mineralização dos contaminantes (MOLINA-BARAHONA et al, 2005; NAKAGAWA & ANDRÉA, 2006). Esta técnica tem recebido maior atenção devido às potenciais vantagens sobre as técnicas convencionais de limpeza, que conforme já citado, incluem baixo custo e redução dos efeitos de risco de impacto ambiental.

No mar a degradação de hidrocarbonetos de petróleo é realizada, principalmente, por microorganismos, e as comunidades microbianas do ecossistema marinho envolvidos neste processo têm sido extensivamente avaliadas (YAKIMOV et al, 2007). Diferentes estudos têm

demonstrado que as comunidades microbianas indígenas são compostas por bactérias marinhas degradadoras de hidrocarbonetos tais como petróleo (GERTLER et al, 2012). E já está bem documentado que a adição de nitrogênio e fósforo influenciam significantemente o crescimento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (HASSANSHAHIAN et al, 2014).

Capítulo 2

JUSTIFICATIVA

A elevada potencialidade do uso de microorganismos, apontados na literatura como agentes degradadores das mais diversas substâncias, indicam o tratamento biológico como um dos mais promissores modos de reduzir os efeitos adversos dos hidrocarbonetos sobre o meio ambiente (D'ANNIBALE et al, 2006). Desta forma, a aplicação de técnicas de biorremediação vem se destacando como uma das estratégias mais promissoras a serem adotadas no tratamento de áreas contaminadas por hidrocarboneto de petróleo (THAVASI et al, 2011).

O processo de biorremediação necessita de um monitoramento eficaz para definir se a estratégia de tratamento implementada está se mostrando eficiente ou se está comprometendo de forma negativa o ecossistema local, pois umas das principais perdas dos nutrientes no meio ambiente ocorre devido à ação da lixiviação, volatilização e outras instabilidades químicas (XU et al, 2003; XU et al, 2005), o que ocasiona muitas vezes em insuficiência de nutrientes reduzindo assim a ação dos microorganismos. No entanto, devemos ter muito cuidado, pois de acordo com Dibble et al (1979), a aplicação excessiva de nutrientes pode potencializar o processo de eutrofização no meio marinho.

Sabe-se hoje em dia que apenas uma pequena fração dos microorganismos presente no meio ambiente (1 a 10%) podem ser cultivados por técnicas convencionais. O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, associadas ao conhecimento em bioinformática, tornou possível a caracterização de comunidades microbianas mistas em determinados ecossistemas, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos (WATANABE et al, 2001; CUNHA et al, 2006; VON DER WEID et al, 2007)

A análise de seqüências de RNA ribossômico permite um conhecimento maior a cerca da filogenia e evolução microbiana (WATANABE et al, 2001) O uso do gene *rrs*, que cofidica o rRNA 16S nas técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e DGGE (Eletroforese em gel de gradiente de desnaturantes) permite uma avaliação da comunidade microbiana dominante de um ambiente. O *Fingerprinting* da comunidade microbiana gerado por estas técnicas serve para avaliar a estrutura da comunidade dominante de um ambiente natural após

a interferência de fatores ambientais e/ou da presença de um poluente. (WATANABE et al, 2001; CUNHA et al, 2006; VON DER WEID et al, 2007)

Diante do exposto acima, o uso de fertilizantes de liberação lenta pode realizar um fornecimento contínuo de nutrientes, mantendo um estado nutricional suficiente através de uma relação ótima de C:N:P para manutenção da atividade microbiana e concomitante biorremediação, possivelmente com redução dos custos do processo (XU et al, 2003; XU et al, 2005). Essa metodologia de remediação, acoplada com as tecnologias moleculares, podem permitir melhores informações a cerca do mecanismo de degradação e aumentar a chance de recuperar e proteger esses ecossistemas que são tão importantes para a população humana.

Capítulo 3

OBJETIVOS GERAL

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral imobilizar nitrogênio e fósforo em diferentes matrizes poliméricas, criando produtos de liberação lenta e verificando sua viabilidade quanto ao uso de bioestímulo para microorganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo em ambientes marinhos.

3.2. Objetivos Específicos

- Imobilizar nitrogênio e fósforo em diferentes matrizes poliméricas através das técnicas de encapsulamento.
- Comparar os produtos de liberação lenta, quanto a cinética de liberação nutricional em sistema líquido e selecionar o mais adequado para posterior aplicação.
- Avaliar o produto de liberação lenta escolhido, e compará-lo com um produto comercial em relação ao mecanismo de bioestimulação de microrganismo, relacionando com produção de biomassa, degradação de carbono, nitrogênio e fósforo residual.
- Melhorar o produto de liberação lenta quanto à relação de nitrogênio e fósforo encapsulado, utilizando uma análise fatorial completa.
- Usar o produto de liberação lenta, aperfeiçoado, em microcosmo na biorremediação de ambiente marinho contaminado por hidrocarbonetos de petróleo e compará-lo com produto comercial Osmocote® e Atenuação natural.
- Monitorar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a comunidade microbiana utilizando Técnicas de Biologia molecular (PCR/DGGE).

Capítulo 4

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Petróleo

4.1.1. Formação e Composição

O petróleo é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e cor variando entre o negro e o castanho escuro (ALVAREZ et al, 2008). Este é uma fonte de energia não renovável, de origem fóssil. A formação do petróleo ocorre na rocha matriz, como resultado da decomposição de matéria orgânica que foi capaz de se depositar no fundo de mares e lagos. Porém, o petróleo não permanece nesta, ele se desloca até as rochas reservatórias ou bacias sedimentares onde se acumula nos poros. O petróleo tende a migrar ao longo dos anos para as superfícies, uma vez que possui densidade inferior às rochas. Este fenômeno, chamado de exudação, nem sempre ocorre, uma vez que no meio do percurso, o petróleo pode se deparar com barreiras físicas como rochas impermeáveis, permanecendo confinado e formando assim um reservatório (MARGOT et al, 2000; VAN HAMME et al, 2003; CRAPEZ et al, 2002). O petróleo é formado por processos biogeoquímicos e, por isso, é uma mistura complexa de alcanos, alcenos, cicloalcanos e compostos aromáticos. De acordo com a predominância dos hidrocarbonetos encontrados no óleo cru, o petróleo é classificado em parafínico, naftênico, misto (quando há predominância de hidrocarbonetos paraníficos e naftênicos) ou aromático (predominância de hidrocarbonetos aromáticos). Dentre esses compostos, os aromáticos são considerados raros, produzindo solventes de excelente qualidade e gasolina de alto índice de octanagem (ABALOS et al., 2004). Além dos hidrocarbonetos, também são constituintes do petróleo os compostos sulfurosos, nitrogenados, oxigenados e ainda compostos metálicos. Pesquisas com espectrometria de massa com alta resolução têm identificado mais de 17.000 componentes químicos distintos presentes no petróleo, sugerindo assim um novo termo quando se refere

aos seus componentes, os chamados “petroleomics” (MARSHALL & ROGERS, 2003). O destino dessas substâncias após um derrame nos ecossistemas marinhos tem despertado grandes interesses nestes estudos, pois estes estão sujeitos a interações de vários fatores físicos, químicos e biológicos levando a diferentes processos de remoção. (CRAPEZ et al, 2002; HEAD et al, 2006).

As remoções de produtos derivados do petróleo do ambiente diferem de acordo com a composição e estrutura química destes. Os processos mais importantes que têm influência sobre os hidrocarbonetos são: sorção, volatilização, transformação abiótica (química ou fotoquímica) e biotransformação. A sorção e a volatilização não destroem os contaminantes, mas apenas os concentram ou transferem para outro meio (THAVASI et al, 2011). As transformações abióticas químicas envolvendo contaminantes orgânicos são geralmente lentas e as reações fotoquímicas são pouco significativas na maioria dos ambientes. Porém, é bem conhecida a existência de várias bactérias marinhas capazes de realizar a transformação destes contaminantes, possibilitando a biorremediação dessas áreas impactadas (TANAKA et al, 2008).

4.1.2. Transporte de hidrocarbonetos e derramamentos marinhos

A produção mundial de petróleo bruto é de aproximadamente 86 milhões de barris /dia e estima-se um aumento para 118 milhões de barris /dia até 2030 (EBENHACK, 2006 apud AGHAMIRI et al, 2011).

No Brasil a TRANSPETRO é a maior empresa responsável pelo transporte marítimo de hidrocarbonetos, realizado pelos navios petroleiros, que atuam tanto na navegação de longo curso como na navegação de cabotagem ao longo de toda a costa brasileira. A interligação com a terra é feita através dos terminais marítimos, distribuídos ao longo de toda costa, que representam peças-chave nesta cadeia logística (TRANSPETRO, 2012).

Uma vez que o petróleo e seus derivados respondem pela maior parte dos granéis líquidos transportados pela costa brasileira e pelos mares do mundo, os impactos advindos da navegação tornam-se relevantes. Segundo ITOPF apud Nikolopoulou et al (2013); foram lançadas no mar 5,7 milhões de toneladas de óleo devido a incidentes com petroleiros entre 1970 e 2011 mas, apesar da percepção popular, a maioria dos derrames de petróleo marinhos são relativamente pequenos se comparado a outras atividades humanas como eliminação de resíduos (KIRBY & LAW, 2008).

A atividade de transporte de petróleo e derivados tem grande potencial poluidor, principalmente devido ao grande volume em operação. O transporte de petróleo e derivados pode causar descargas de portes variáveis, desde as maiores proporcionadas por acidentes

com petroleiros até as relativamente pequenas, mas frequentes, por descargas operacionais, no entanto esses vazamentos podem ser desastrosos e diminuir a população de espécies biológicas em determinadas áreas, reduzir a qualidade do sedimento e deteriorar o pescado e a criação de crustáceos (CRAPEZ, 2002; KIRBY & LAW, 2008).

4.1.3 Impactos ambientais do petróleo

Os efeitos no meio ambiente decorrentes de derrames de petróleo e de derivados podem ser classificados como agudos ou crônicos. Impactos agudos são aqueles que causam efeitos letais aos organismos, geralmente decorrentes de um evento acidental que os expõe ao agente contaminante por um curto período de tempo, sendo as frações tóxicas solúveis em água rapidamente diluídas, procedendo à recuperação da área atingida a partir do recrutamento de organismos oriundos de regiões não atingidas. Caracteriza-se a poluição crônica pela exposição prolongada ao agente contaminante, fazendo com que as frações tóxicas persistam no ambiente, dificultando ou mesmo inviabilizando a recuperação do mesmo. Os impactos crônicos geram efeitos sub-letais que podem afetar algum estágio do ciclo de vida do organismo como o crescimento, a reprodução e o desenvolvimento larval. Esses impactos decorrem de atividades desenvolvidas ao longo dos anos, sendo este tipo de poluição considerada ecologicamente mais grave do que a aguda (SILVA,2004).

Um derrame pode provocar uma série de impactos, dentre eles alterações físicas e químicas dos habitats naturais, resultante, por exemplo, da incorporação do óleo ao sedimento, recobrimento físico da fauna e flora, efeitos letais ou sub-letais nos organismos e mudanças nas comunidades biológicas resultantes dos efeitos do óleo sobre organismos-chave. Esses efeitos podem ser divididos em visíveis e não visíveis. Os efeitos visíveis podem ser caracterizados pela morte de organismos (aves, mamíferos marinhos, peixes, etc.), o gosto de óleo nos recursos pesqueiros e sujeira nas praias, redes de pescas e embarcações, enquanto que os efeitos não visíveis representam interferências nos diversos níveis de organização de um sistema, desde as funções celulares e fisiológicas até a estrutura ecológica das comunidades aquáticas (KHANNA & BARUA, 2001).

Outras consequências em se tratando de efeitos em curto prazo podem ser: recobrimento e asfixia dos organismos, reduzindo a luminosidade, diminuição o oxigênio dissolvido, e assim causando danos às aves aquáticas e toxidade do produto derramado. Já os efeitos em longo prazo não são tão aparentes, além do que alguns compostos podem ser bioacumulados ao longo da cadeia trófica podendo trazer efeitos nocivos ao homem. Efeitos sub-letais relacionados com a toxidade dos hidrocarbonetos repercutem na capacidade de reprodução, crescimento e alimentação, tendo estes sido observados experimentalmente.

A extensão dos impactos causados pelo derramamento de petróleo no ambiente está diretamente relacionada à quantidade e tipo de óleo derramado, às características do ambiente atingido e sua sensibilidade, além do tempo de permanência do petróleo no meio ambiente (KINGSTON et al, 2003). Mesmo que em pequeno porte, um derrame pode levar a danos irreversíveis, e quando ocorrem nas proximidades costeiras, esses danos são ainda maiores. O óleo no sedimento, e mesmo em concentrações relativamente baixas, pode alterar a estrutura das comunidades bentônicas, seja através de uma poluição aguda ou crônica. As espécies sensíveis morrem ou abandonam o local e são substituídas por espécies oportunistas tolerantes ao óleo. O número total de espécies diminui e, geralmente, a biomassa também diminui. (CRAPEZ, 2002; KIRBY & LAW, 2008).

Os efeitos biológicos dos hidrocarbonetos de petróleo sobre os organismos marinhos dependem de sua persistência e biodisponibilidade, da capacidade dos organismos de acumular e metabolizar diversos hidrocarbonetos, do destino dos produtos metabolizados e da interferência dos hidrocarbonetos sobre os processos metabólicos normais que podem alterar as chances de sobrevivência e reprodução de um organismo no meio ambiente. Com a finalidade de compreender os efeitos do derrame de petróleo, a tabela 1, mostra as interferências na ecologia das comunidades biológicas e os impactos nos recursos pesqueiros (CRAPEZ, 2002).

A região costeira apresenta grande riqueza biológica, abrigando boa parte da biodiversidade marinha. A costa brasileira, com 7.491 km de extensão, apresenta inúmeros ecossistemas típicos: manguezais, costões rochosos, praias, recifes de coral, marismas e águas abertas. Muitos desses ecossistemas costeiros tornam-se mais vulneráveis quando têm em suas proximidades terminais marítimos, onde ocorrem as atividades de carga e descarga dos navios (CETESB, 2011).

Nos ecossistemas de manguezais, os derrames de óleos podem gerar um efeito tóxico sobre as raízes e sobre os organismos deste “habitat”. Pode também ocorrer, uma redução da diversidade microbiana, além de recobrimento da fauna e da zona de trocas gasosas dos vegetais. Nos marismas, ocorre absorção da fração tóxica do óleo através de folhas ou raízes podendo causar envenenamento pela ruptura das membranas e organelas celulares. Nas praias e costões rochosos, o impacto varia em função do hidrodinamismo, ocasionando recobrimento, intoxicação dos organismos, e provocando assim interferência nos processos de locomoção, alimentação e reprodução. Em se tratando dos recifes de coral, óleos leves representam mais perigo por conterem maior quantidade de frações tóxicas solúveis, além do que óleos pesados dificilmente entram em contato com recifes (SILVA, 2004).

Tabela 1 - Efeitos do derrame de petróleo em ambiente marinho sobre as comunidades biológicas

Comunidades		Efeito
Bactérias		Positivos para os grupos que degradam o óleo, com expressivo aumento das populações, e negativos para os grupos que não tem afinidade com os mesmo.
Plâncton	Biomassa e produtividade do fitoplâncton	Aumento devido à diminuição da pastagem; depressão da clorofila a.
	Zooplâncton	Redução da população; contaminação.
Bentos	Anfípodas, isópodas, ostracodas	Mortalidade inicial; população decresce.
	Moluscos, especialmente bivalves	Mortalidade inicial, contaminação, histopatologia
	Poliquetas oportunistas	População aumenta
	Comunidades dos Macrobentos	Decréscimo de diversidade
Entre marés e litoral	Crustáceos e caranguejos	Mortalidade inicial; população decresce.
	Moluscos	Mortalidade inicial; contaminação, histopatologia
	Poliquetas oportunistas	População aumenta
	Maioria das comunidades	Decréscimo de diversidade
Algas		Decréscimo de biomassa; espécies são substituídas.
Peixes	Ovos e larvas	Diminuição de eclosão e sobrevivência
	Adultos	Mortalidade inicial; contaminação, histopatologia. Normalmente afastam-se do local atingido.
Aves	Adultos	Mortalidade por esgotamento físico (recobrimento), intoxicação; decréscimo populacional.

Fonte: CRAPEZ, 2002.

4.1.4 Efeitos prejudiciais às atividades socioeconômicas e à saúde humana

Os principais impactos socioeconômicos da contaminação por petróleo ou seus derivados são decorrentes da paralisação das atividades econômicas associadas ao mar ou aos ecossistemas contaminados, dos riscos intrínsecos à saúde pública, como as mortes por explosões e incêndios, da intoxicação causada pela ingestão de alimentos contaminados ou problemas dermatológicos e irritações nos olhos, causados pelo contato direto com o óleo. (SILVA, 2004). De acordo com Fernandez et al (2002), o primeiro relato de câncer como efeito da exposição ao piche, alcatrão e a fuligem foi feito em 1775 pelo cirurgião Sir Percival Pott, quando reportou a alta incidência de câncer no órgão reprodutor masculino entre limpadores de chaminés na Grã- Bretanha. Porém, somente 150 anos mais tarde, é que foram identificados os componentes cancerígenos da fuligem como sendo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Atualmente, diversos órgãos nacionais e internacionais reconhecem os perigos em potencial da ocorrência dos hidrocarbonetos do petróleo no meio ambiente. Até hoje foram reportados mais de 30 compostos e centenas de derivados dos HPAs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos) apresentando efeitos cancerígenos, fazendo deles a maior classe de compostos cancerígenos conhecida. Além disso, eles apresentam uma ampla distribuição no meio ambiente, possuem elevada tendência a bioacumulação e são altamente recalcitrantes. (FERNANDEZ et al, 2002)

4.1.5 Tratamentos de áreas contaminadas com derivados de petróleo

Conforme foi citado anteriormente, a complexidade e dificuldades de remediação de áreas contaminadas por petróleo e seus derivados nos remete a busca de forma mais eficaz para o tratamento destes. De acordo com THAVASI et al (2011), os métodos de tratamento mais utilizados para remediação de áreas contaminadas pela indústria de petróleo são normalmente divididos em 2 grandes categorias: métodos físico-químicos e biológicos. Os tratamentos físicos envolvem barreiras de contenção, “skimmers” e materiais adsorventes e não recupera mais que 10-15% do óleo derramado e a utilização de agentes químicos tensos ativos não são favorecidas devido aos seus efeitos tóxicos sobre a biota existente na área poluída (NIKOPOULOU & KALOGERAKIS, 2009; ZAHED et al, 2010). Os tratamentos biológicos são baseados na capacidade das comunidades microbianas ou de plantas de imobilizar ou degradar esses contaminantes (YAKIMOV et al, 2007). Estes tratamentos, comparados aos processos físico-químicos, são mais seguros e com custo relativamente baixo. Além disso, o aumento das pesquisas nessa área está relacionado ao fato de que o tratamento biológico é menos agressivo ao meio ambiente, já que, muitas vezes, concentra seus esforços em otimizar o processo naturalmente existente, gerando assim uma grande aceitação por parte

da opinião pública, por ser considerado uma “forma natural” de tratamento. (BRITO et al, 2004; D’ANNIBALE et al, 2006; THAVASI et al 2011).

4.2. Biorremediação

4.2.1. Aspectos Gerais

A biorremediação tem sido definida de muitas formas. A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) apresenta uma definição genérica sobre a prática da biorremediação: “biorremediação é o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas”. O Escritório de Estudos Geológicos do Departamento do Interior do Governo Americano (USGS), por sua vez, adota a definição do American Heritage Dictionary of the American Language que define biorremediação como: “O uso de agentes biológicos tais como microrganismos e plantas, para remover ou neutralizar contaminantes, como poluentes do solo e da água” (CHAPELLE apud MARTINS et al, 2003). Em resumo, a biorremediação é a estratégia que busca a remediação ambiental, através do estudo, controle e aplicação da propriedade biodegradativa dos microrganismos. Esse conceito, de que os microrganismos podem utilizar hidrocarbonetos como fontes de carbono e energia, é difundido há muito tempo. Em 1895, um estudo mostrou a degradação da parafina pelo fungo *Botrytis cinerea*. Desde então, o metabolismo de hidrocarbonetos tem sido extensivamente estudado. (ALEXANDER & LOEHR, 1999).

O Brasil vem intensificando estudos na área de biorremediação, objetivando reduzir alguns impactos ambientais resultantes de derramamentos acidentais de óleo. Sabe-se que este é composto de uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos (n-alcanos), alicíclicos e aromáticos. Não somente os solos têm recebido esse destaque, mas também a descoberta de que certas bactérias que vivem nos sedimentos marinhos, inclusive nas areias das praias, podem degradar os componentes do petróleo abrindo a possibilidade de usar métodos biológicos no tratamento dos derrames também em ambientes marinhos (CRAPEZ et al, 2002; DAS & CHANDRAN, 2011). Muitos estudos têm indicado que além dos microrganismos com habilidade em degradar hidrocarbonetos de petróleo, as características do local, concentração, tipo do contaminante e diferentes parâmetros físicos e químicos ambientais, como por exemplo: pH, temperatura, concentração de oxigênio, nutrientes inorgânicos tem influenciado na biorremediação de petróleo em ambientes marinhos. (MORAIS et al, 2009; HASSANSHAHIAN et al, 2014).

4.2.2 Fatores que afetam o processo de biorremediação

A seguir serão apresentados alguns dos principais fatores que afetam o processo de biorremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

4.2.2.1 Temperatura

A temperatura tem profundo efeito não só nas características físicas (solubilidade, sorção, viscosidade, volatilização) dos contaminantes presentes no ambiente, mas também no metabolismo microbiano (NEFF et al, 2006). Em temperaturas baixas, hidrocarbonetos líquidos se transformam em parafinas sólidas, hidrocarbonetos solúveis precipitam e ocorre uma queda considerável na solubilidade destes. Estas características físicas alteradas podem interferir significativamente na disponibilização destes contaminantes para os microrganismos responsáveis pela biodegradação, afetando assim as taxas de degradação dos mesmos (VENOSA & ZHU, 2003). Coulon et al (2007), em seu estudo sobre o efeito da temperatura no processo de bioestimulo de microrganismos degradadores de óleo em ambiente estuarino observaram que quando a temperatura foi aumentada de 4ºC para 20ºC, houve um efeito positivo em todos os tratamentos de microcosmo e a degradação de HTP (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo) foi máxima.

4.2.2.2 Concentração de oxigênio

Condições aeróbias são necessárias para que ocorra a biodegradação relativamente rápida de hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que a degradação anaeróbia destes compostos tende a ser mais lenta, apesar de alguns autores já terem demonstrado bons resultados de degradação em anaerobiose (HU et al, 2007; KASAI et al, 2007). O oxigênio é utilizado pelos microrganismos não só como aceptor final de elétrons na respiração aeróbia, mas também como substrato nas reações biodegradativas catalisadas pela enzima oxigenase. Isto inclui o rompimento dos anéis, a hidroxilação dos compostos aromáticos e a oxidação dos compostos alifáticos (LEE et al, 2006). Maki et al (2005), relataram em seu estudo que a foto-oxidação aumentou a biodegradabilidade dos hidrocarbonetos de petróleo, aumentando sua biodisponibilidade e melhorando assim as atividades microbianas.

4.2.2.3 pH

A atividade microbiana é fortemente dependente do pH do meio. Valores extremos de pH são inibitórios para a grande maioria dos processos microbianos de degradação (BOSZCZYK-MALESZAK et al, 2006). Além de estar diretamente relacionada ao metabolismo dos microrganismos, a alteração do pH pode influenciar a solubilidade dos contaminantes em água como também a intensidade da sorção destes no solo (SHIN & KIM,

2004). Segundo Xia et al (2006), em seu estudo sobre conhecimento da biodegradação de óleo diesel em água do mar suplementada com nutrientes foi verificado que a utilização de NO3-N, aumentou a bioestimulação dos microrganismos quando comparada a adição de NH4 como fonte de nitrogênio. Neste caso, os autores associaram o efeito da produção de ácido gerado pelo metabolismo do microrganismo que alterou o pH do meio e assim inibiu a degradação do óleo.

4.2.2.4 Nutrientes

Os nutrientes essenciais ao crescimento celular são o nitrogênio e o fósforo, os quais devem estar balanceados, proporcionado uma boa relação com o carbono (KIM et al, 2005). Geralmente em ambientes contaminados por hidrocarbonetos, o aumento da quantidade de carbono proveniente deste contaminante faz com que os nutrientes necessários para o crescimento ótimo microbiano estejam presentes em quantidades inferiores. Assim, frequentemente há necessidade de correção das concentrações de nitrogênio e fósforo utilizando fontes externas desses nutrientes como sais inorgânicos (amônios, nitratos e fosfatos) ou fertilizantes utilizados na agricultura, como uréia (YU et al, 2005; COULON et al, 2007).

Por outro lado, vários autores relatam em seus trabalhos que as concentrações excessivas de nutrientes também podem inibir a atividade de biodegradação (CHAÎNEAU et al, 2005; CHAILLAN et al, 2006).

4.2.3 Técnicas de Biorremediação

Conforme foi observado anteriormente, vários fatores relacionados ao contaminante e ao ambiente podem limitar a extensão dos processos de biodegradação. O estabelecimento de condições ambientais e o uso da técnica adequada é fundamental para que o processo de biorremediação aconteça de forma eficaz (HASSANSHAHIAN & EMTIAZI, 2008). De acordo com Nikolopoulou & Kalogerakis, (2009); as técnicas mais utilizadas na biodegradação de petróleo e seus derivados são: o aumento da microbiota através da adição de microrganismos endógenos ou exógenos (Bioaumento e/ou Bioenriquecimento) e adição de fontes de nutrientes (Bioestimulo).

4.2.3.1. Bioaumento e/ou Bioenriquecimento

A densidade de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos presentes em ambientes contaminado a ser remediado é um fator que influencia a taxa e a extensão da biodegradação. Em situações onde a população microbiana degradadora dos sítios contaminados é pequena ou não é capaz de degradar misturas complexas de hidrocarbonetos,

como por exemplo, o óleo cru, a inoculação com uma concentração maior de microrganismos degradadores torna-se uma estratégia interessante. A mesma deve ser aplicada visando aumentar a biodegradação do composto poluente e reduzir o período de adaptação dos microrganismos presentes nos locais contaminados. Esta estratégia recebe a denominação de bioaumento, quando os microrganismos inoculados são endógenos (extraídos do próprio ambiente contaminado, crescidos *in vitro* e reintroduzidos no ambiente em maior concentração), ou de bioenriquecimento, quando os microrganismos inoculados são exógenos (microrganismos não nativos introduzidos no ambiente contaminado) (ROMANTSCHUK et al, 2000; UENO et al, 2007). No entanto alguns autores adotam o termo bioaumento para ambos os casos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002; HAMDIA et al, 2007).

Particularmente, no que se refere a técnica de bioenriquecimento, a mesma pode ainda englobar a utilização de OGM's (Organismos Geneticamente Modificados). A troca de material genético tem sido apresentada como um dos fatores que afetam a obtenção da capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos, durante o período de adaptação dos mesmos nas áreas contaminadas (RIZZO et al, 2008). Essa troca de material genético pode ocorrer de forma natural, através da transferência de plasmídeos, ou através de modificações genéticas realizadas em laboratório. No entanto, existem restrições legais quanto ao uso de OGM's no processo de remediação (CONAMA nº 8, 2009).

4.2.3.2 Bioestímulo

O bioestímulo é uma das estratégias mais adotadas em processos de recuperação de áreas impactadas e consiste na correção das condições nutricionais (nitrogênio, fósforo, potássio), de aeração, e de pH, para aumentar a atividade da população existente nas áreas contaminadas (AULENTA et al, 2005; BENTO et al, 2005; AYOTAMUNO et al, 2006; RIZZO et al, 2008). Já foi relatado anteriormente que dois são nutrientes essenciais ao crescimento celular, o nitrogênio e o fósforo, os quais devem estar balanceados, propiciando uma boa proporção com o teor de carbono. Por isso, frequentemente após alguma situação onde há aporte de carbono, necessita-se corrigir também as concentrações de nitrogênio e fósforo para que os microrganismos degradadores ali presente se desenvolvam e a para que isso ocorra, fontes externas de nutrientes como sais inorgânicos (amônio, nitratos e fosfatos) ou fertilizantes utilizados na agricultura, como ureia são utilizados (COULON et al, 2007; YU et al, 2005). Muitos estudos tem demonstrado que a estimulação de bactérias degradadoras com nutrientes na fração adequada pode melhorar significativamente as taxas de biorremediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (NIKOLOPOULOU & KLOGERAKIS, 2009). Zahed et al (2010), em seu estudo sobre

biodegradação de n-alcanos provenientes de óleo bruto em águas marinhas, observou que ao estimular a comunidade microbiana indígena com 188,71mg/L de nitrogênio e 18,99 mg/L de fósforo, conseguiu remover 92,04% de n-alcanos.

Rosa & Triguis (2007), também realizaram experimento utilizando NPK líquido como forma de bioestímulo de microrganismos para verificar a biodegadação de óleo em derrames no mar e constataram uma redução 30% de n-alcanos e isoprenóides em 4 dias e 85% de degradação de compostos policíclicos aromáticos alquilados no final de 28 dias de experimento.

Recentemente, diversos estudos vêm avaliando a utilização de fertilizantes de liberação lenta, como uma forma de bioestímulo, para fornecer as concentrações de nutrientes necessárias ao processo de biorremediação (XU et al, 2004; XU et al, 2005; LIANG & LIU, 2006; WU et al, 2008; SILVA, 2008). Esses produtos são usualmente utilizados para diferentes cultivares agrícolas e fornecem nutrientes para as culturas durante todo o seu ciclo de crescimento. Apresentam ainda, diversas concentrações de nutrientes com diferentes espessuras de camada protetora, o que garante a liberação desses nutrientes num período de 45 dias a 14 meses. Essas cápsulas são revestidas normalmente, por uma resina orgânica que é degradada com o esgotamento dos nutrientes (MENDONÇA et al, 2008). É possível observar na figura 1 o esquema de liberação dos nutrientes pelos fertilizantes de liberação lenta. A água penetra pela resina e dissolve os nutrientes, possibilitando sua liberação para o meio. Esta liberação ocorre por pressão osmótica, podendo variar de intensidade conforme as variações de umidade e temperatura (MENDONÇA et al, 2008).

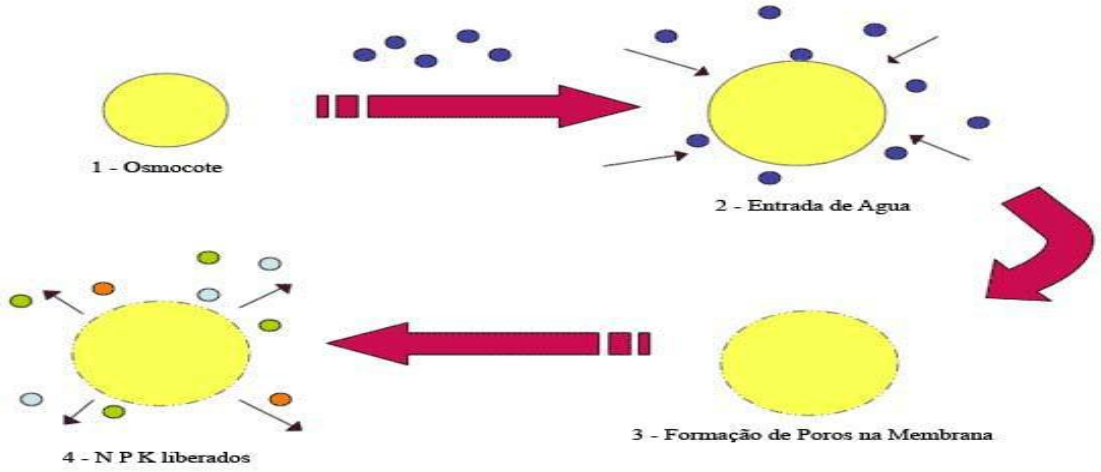


Figura 1 - Esquema de um Fertilizante de Liberação Lenta (SILVA, 2008).

4.3. Encapsulamento "Estado da Arte"

4.3.1 Histórico

O conceito de microcápsula surgiu da idealização do modelo celular. Neste, a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e saída de material da célula (FINOTELLI, 2002). Os primeiros registros de tentativas de aplicação dessas ideias datam dos anos 30, mas o primeiro produto reconhecido com material microencapsulado só surgiu em 1954. A empresa norte-americana National Cash Register foi a pioneira, ao comercializar um papel de cópia sem carbono, revolucionando a indústria de formulários. Esse papel recebia uma fina camada de microcápsulas, liberando a tinta incolor que, ao entrar em contato com reagente, tornava-se colorida, produzindo em outra folha uma cópia idêntica ao que estava sendo escrito no primeiro papel. De acordo com Thies, 1995, as primeiras pesquisas na área farmacêutica, realizadas pela Universidade de Wiscosin (EUA), também datam dos anos 50. Na área de alimentos, os estudos foram iniciados nos anos 60 pelo Instituto de Pesquisas South West (EUA), com a microencapsulação de óleos essenciais para prevenir a oxidação e a perda de substâncias voláteis e controlar a liberação de aroma.

4.3.2 Definição

A microencapsulação é definida como a tecnologia do empacotamento de materiais sólidos, líquidos e gasosos, em minúsculas cápsulas seladas, isolando-os e protegendo-os das condições ambientais adversas, como luz, oxigênio, umidade e interações com outros compostos, as quais podem liberar seus conteúdos a taxas controladas em condições específicas. Essas embalagens em miniaturas, que são chamadas de microcápsulas, podem variar de "sub-micron" a alguns milímetros de tamanho e são idealmente esféricas; entretanto a estrutura é fortemente influenciada pela estrutura do material original. O material encapsulante é denominado filme ou material de parede, enquanto o encapsulado é chamado de material ativo, núcleo ou fase interna (MATIOLI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2003; BASTOS et al, 2009; FRITZEN-FREIRE et al, 2013).

A microcapsulação pode potencialmente oferecer inúmeros benefícios aos materiais que estão sendo encapsulados. Várias propriedades dos materiais ativos podem ser modificadas pela encapsulação. Por exemplo, propriedades de manuseamento e fluidez podem ser melhoradas pela conversão da forma líquida para a sólida encapsulada. Materiais higroscópicos podem ser protegidos da umidade. Ingredientes voláteis, sensíveis ao calor, luz

e oxidação podem ser conservados. Materiais que a princípio são incompatíveis podem ser misturados e usados seguramente (FINOTELLI, 2002; CHAN et al, 2009).

Alguns autores citam motivos para o uso da microencapsulação, dentre os quais estão: capacidade de modificar e melhorar a aparência de uma substância; reduzir a reação do agente ativo com o ambiente em que o mesmo será aplicado; diminuir a velocidade de difusão do agente ativo do interior da célula para o meio, promover a liberação controlada; mascarar odores e sabores desagradáveis e até facilitar uma diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia (SILVA et al, 2006; RODRIGUEZ-NÚÑES et al, 2012).

4.3.3 Micropartículas: Microesferas e Microcápsulas

Quanto a morfologia, estas micropartículas são classificadas segundo sua estrutura, podendo ser microcápsulas quando esta possui um núcleo com o material ativo, rodeado por uma membrana que será composta pelo agente de parede, ou ainda, pode ser classificada como microesfera quando o material ativo está disperso por toda a matriz polimérica composta por uma matriz homogênea e, neste caso, o material encapsulado pode ser incorporado à matriz polimérica através da adsorção ou ligado covalentemente, conforma a figura 2 (MADENE et al, 2006; MATTÉ & DA ROSA, 2013).

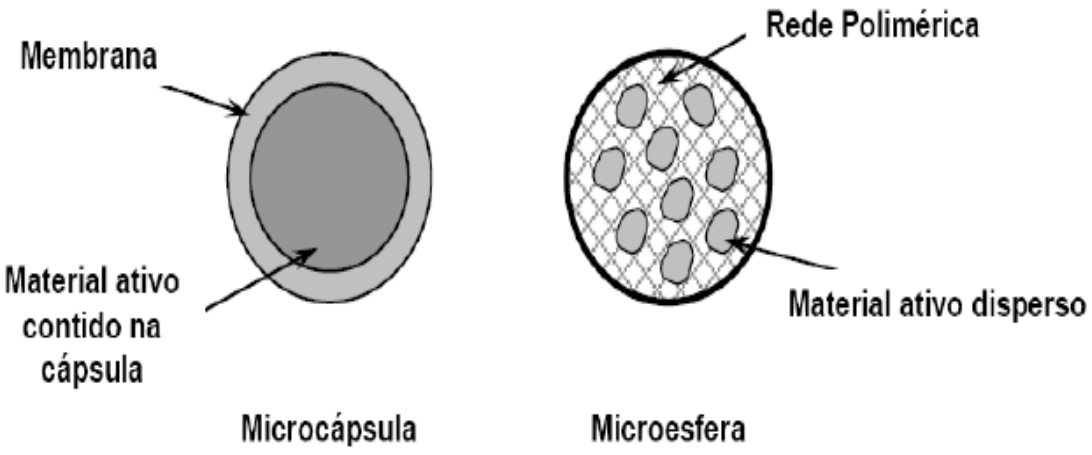


Figura 2: Ilustração esquemática de microcápsulas e microesferas (Matté and da Rosa, 2013).

Segundo Favaro Trindade et al, (2008), os métodos de preparação de micropartículas classificam-se em : métodos físicos (*Spray drying, Spray chiling, Spray cooling*, co-cristalização e liofilização), métodos químicos (Inclusão molecular e polimerização interfacial), métodos físicos-químicos (coacervação, separação de fase orgânica em formação de lipossomas).

4.3.4 Matriz de revestimento

Um dos principais passos na produção de um revestimento é a escolha do material de parede adequado. Substâncias de revestimento são basicamente materiais formadores de filme que podem ser selecionados a partir de uma ampla variedade de polímeros naturais ou sintéticos, dependendo do material a ser revestido e das características desejadas nas micropartículas (FINOTELLI, 2002; ASCHERI et al, 2003; PIERUCCI et al, 2004; BASTO et al, 2009). O material de parede, para ser ideal necessita ser emulsificante, bom formador de filme, ter baixa viscosidade com altos níveis de sólidos, apresentar alta higroscopicidade, favorecer a adequada liberação do conteúdo quando reconstituído no produto final. Dentre os materiais de parede mais utilizados incluem-se carboidratos (amido, maltodextrinas, sacarose e ciclodextrinas), celulose (carboximetilcelulose e derivados), gomas (arábica, agar, alginato de sódio, carragena), lipídeos (ceras, parafina e ácidos graxos) e proteínas (glúten, caseína, gelatina e outros) (SUAVE et al, 2006).

4.3.4.1 Alginato

Dentre os diversos polímeros utilizados na tecnologia de liberação lenta de substâncias bioativas, destacamos o alginato ou algin. Este corresponde a um polissacarídeo de parede celular, extraído com álcalis diluídos de várias espécies de algas marrons marinhas (Classe Phaeophyceae, espécies *Fucus serratus, Ascophyllum nodosum, Laminaria digitata, Laminaria cloustonii, Ecklonia maxima e Macrocystis pyrifera*), sendo constituído por resíduos de ácidos α-L-gulurônicos e ácidos β-D-manurônicos unidos por ligações 1 → 4 de composição e estrutura seqüencial amplamente variada (SHILPA et al, 2003; CHAN et al, 2009). Os alginatos comerciais apresentam um grau de polimerização oscilando entre 100 e 1000 e o seu peso molecular costuma encontrar-se no intervalo compreendido entre 32.000 e 200.000 Dalton. Os grupos carboxílicos possuem valores de pKa entre 3,4 e 4,4. A figura 3 exemplifica as unidades constituintes dos alginatos (SHILPA et al, 2003).

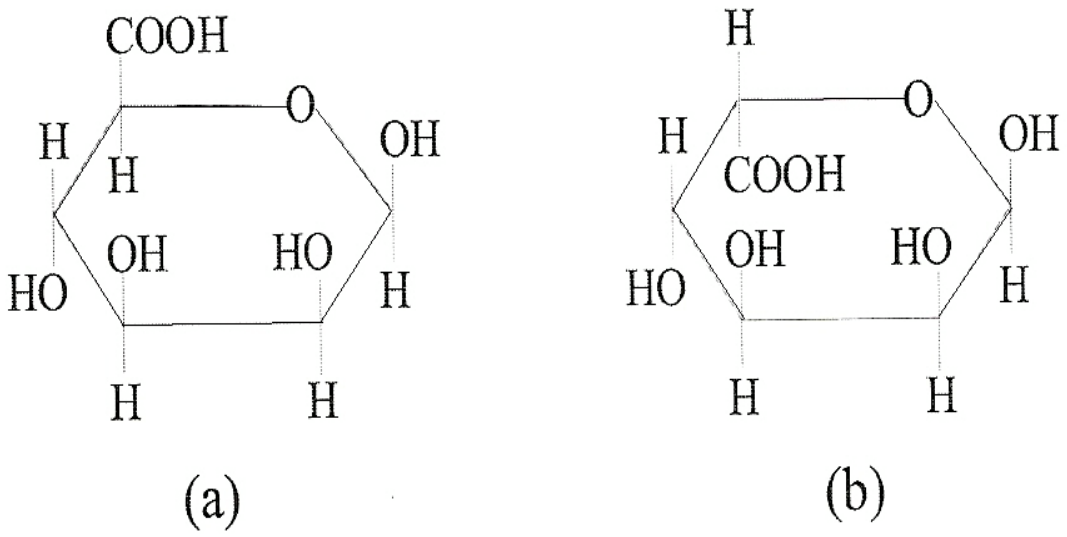


Figura 3: Estrutura química de ácidos algínicos: a) ácido manurônico, b) ácido gulurônico (FRANCHETTI & MARCONATO, 2006).

O ácido algínico e os sais de alginato, formados com metais di e trivalentes (cálcio, por exemplo), são insolúveis em água enquanto que os sais de alginato de metais alcalinos (sódio e potássio, por exemplo), magnésio, amônio quaternário e aminas, ao contrário, apresentam solubilidade em água (SHILPA et al, 2003; FRANCHETTI & MARCONATO, 2006; CHAN et al, 2009). O ácido algínico é um polissacarídeo que naturalmente contém grupos carboxílicos em cada resíduo constituinte e possui várias habilidades para materiais funcionais. A propriedade mais útil dos alginatos é sua habilidade em reagir com cátions polivalentes, especialmente íons de cálcio, para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis utilizados pela indústria de alimentos e biotecnologia (imobilização de células e enzimas). Em outras palavras, os íons cálcio são capazes de formar complexos com quatro resíduos de unidades de ácido gulurônico dando origem, com isso, a uma estrutura conhecida como "Egg Box", conforme demonstrado na figura 4 (SANTACRUZ et al, 2002; RHIM, 2004; BAJPAI & TANKHIWALE, 2006).

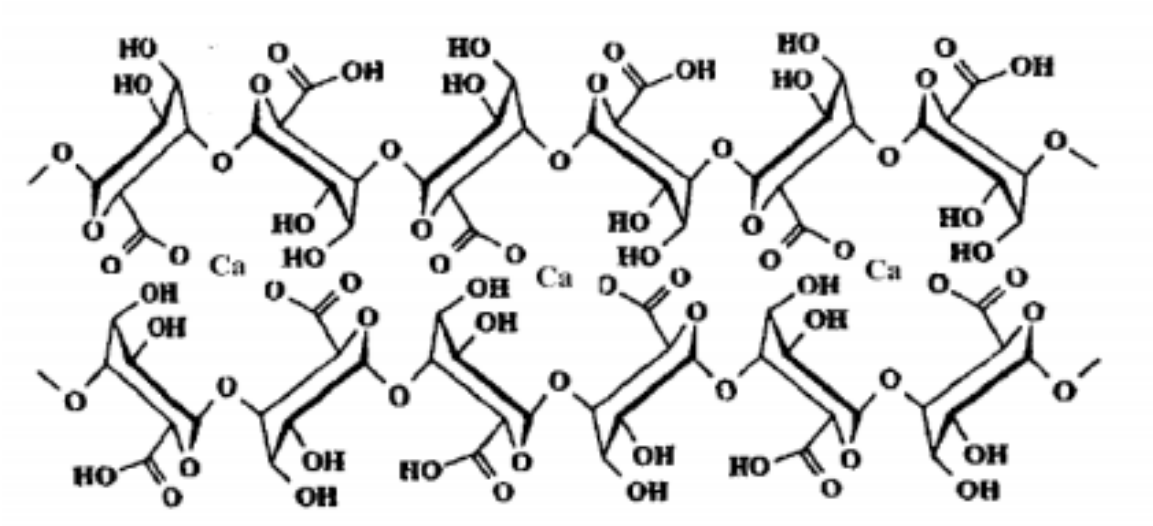


Figura 4: Estrutura Egg Box do alginato de cálcio (BAJPAI & TANKHIWALE, 2006).

Através da adição de íons cálcio ou por acidificação de soluções de alginato sódico, podem ser obtidos géis, películas ou fibras. Em outras palavras, além da gelificação em presença de baixa concentração de íons di e trivalentes à temperatura ambiente, o alginato apresenta também a capacidade de formar gel sem a presença de tais íons, porém em condições de pH igual ou inferior a três. Entretanto, para a formação homogênea de géis, é necessário que a reação ocorra lentamente (SHILPA et al, 2003; FRANCHETTI & MARCONATO, 2006; CHAN et al, 2009). Os resíduos de ácidos L-gulurônico e D-manurônico costumam encontrar-se arranjados em regiões compostas somente de uma ou outra unidade, chamadas de blocos-M e blocos-G, assim como podem apresentar regiões onde as duas unidades alternem. Destaca-se o fato de que os blocos homogêneos costumam apresentar-se mais resistentes a hidrólise que os blocos onde haja alternância de unidades (SHILPA et al, 2003; FRANCHETTI & MARCONATO, 2006). Tanto a proporção entre ácido manurônico e ácido gulurônico (M/G) quanto a estrutura do polímero determinam as propriedades de solubilidade do alginato. A proporção entre os resíduos componentes do alginato é em geral aproximadamente 1,5 (M/G) sendo esta variável em função da procedência do polissacarídeo (SHILPA et al, 2003; FRANCHETTI & MARCONATO, 2006). As soluções dos alginatos são muito viscosas com propriedades que dependem da relação M/G, do peso molecular e do íon que neutraliza os grupos ácidos, presente em solução. Em ausência de cátions di e trivalentes, a viscosidade da solução de alginato será pequena. Por outro lado, o congelamento ou descongelamento de soluções de alginato sódico, em presença de cálcio, pode conduzir ao aumento da viscosidade final da solução. (FRANCHETTI & MARCONATO, 2006; CHAN et al, 2009) A viscosidade das soluções diminui conforme o aumento da temperatura e é ligeiramente influenciada por mudanças do

pH entre 4,5-10, no entanto, aumenta a valores de pH inferiores a 4,5, alcançando o máximo ao redor de 3 - 3,5 (CHAN & ZHANG, 2005; CHAN et al, 2009).

O alginato é de grande interesse e utilização na indústria de alimentos devido às suas propriedades coloidais únicas que incluem espessante, suspensão, formador de filme, gelificante e estabilizante de emulsão. Sendo assim, melhora e estabiliza, em concentrações entre 0,25 e 0,5%, a consistência de recheios, bombons, produtos a base de leite e impede a formação de cristais de gelo em sorvetes, durante sua elaboração e armazenamento. Além disso, é bastante útil no preparo dos mais diversos tipos de géis, incluindo pudins e gelatinas, assim como na estabilização de sucos de frutas e espuma de cerveja (CHAN & ZHANG, 2005; RHIM, 2004).

4.3.4.2 Capsul®

A National Starch and Chemical Corporation dos Estados Unidos desenvolveu, após muitas pesquisas, um amido modificado chamado Capsul® que corresponde a um amido de milho ceroso quimicamente modificado. Esta modificação consiste em acrescentar um componente lipofílico - Succinato de octanil - o que, nas formulações, aumenta a capacidade e a estabilidade de emulsões. Em outras palavras, o Capsul®, também conhecido por amido octenilsuccinato, é obtido pela esterificação do amido com o ácido octenilsuccinato anidro resultando, com isso, num amido hidrofobicamente modificado. A figura 5 exemplifica a reação de obtenção do Capsul® (ABURTO et al, 1998; FINOTELLI, 2002; BORMANN et al, 2011).

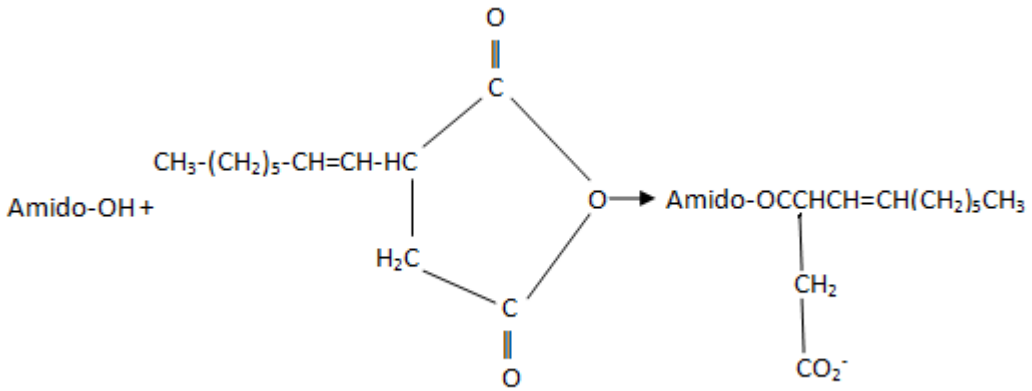


Figura 5: reação de obtenção do octenilsuccinato anidro (ABURTO et al, 1998).

A produção de amidos modificados é uma alternativa que vem sendo desenvolvida há algum tempo com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos amidos nativos e assim aumentar a utilidade e aplicabilidade deste polímero pelas indústrias (SILVA et al, 2006). As razões que levam à modificação do amido incluem alterar as características de gelatinização, diminuir a retrogradação e a tendência das pastas em formarem géis; aumentar a estabilidade

das pastas ao resfriamento e descongelamento, a transparência das pastas ou géis e a adesividade; melhorar a textura das pastas ou géis e a formação de filmes; adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante (SILVA et al, 2006).

O amido representa um polímero com habilidade para o aprisionamento de moléculas em tecnologias de liberação lenta de substâncias bioativas. Esta habilidade encontrada no carboidrato ocorre devido a sua fração amilose que é capaz de formar estruturas helicoidais e, com isso, complexos muito estáveis. Entretanto, devido a sua natureza hidrofílica, o amido e seus hidrolisados não oferecem propriedades emulsificantes quanto aos ingredientes aprisionados em sistemas de liberação controlada (FINOTELLI, 2002; SILVA et al, 2006). O Capsul® tem a capacidade de oferecer excelente propriedade emulsificante para óleos essenciais cítricos, óleos vegetais e uma grande variedade de mistura com voláteis, estabilizando-os para a secagem por atomização. O amido de milho modificado por inclusão de grupamento Iipofílico tem se tornado um substituto de proteínas e da goma arábica por custar em média 3 vezes menos, ser usado em menor quantidade (em peso), além de estar prontamente disponível (BORMANN et al, 2011; FINOTELLI, 2002; ABURTO et al, 1998).

A presença de grupos hidrofóbicos na estrutura do Capsul® torna este amido menos sensível à água. Além disso, a habilidade de formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias deste amido é reduzida, resultando assim na formação de um filme mais flexível e, apesar de constituir-se em um amido modificado, a biodegradabilidade do amido é mantida (BORMANN et al, 2011). O Capsul® é utilizado pelas indústrias farmacêutica e alimentícia com aprovação do FDA como um aditivo alimentar desde que o conteúdo de octenilsuccinato não exceda 3% (BASTO, 2009).

4.3.4.3 Pectina

As pectinas constituem uma classe de polissacarídeos complexos encontrados na parede celular de plantas superiores (THAKUR et al, 1997). É predominantemente um polímero linear de resíduos do ácido D-galacturônico em ligação α (1-4) e contém quantidades variadas de substituintes metil-éster (figura 6), dependendo da fonte natural ou método de preparação (THAKUR et al, 1997; WILLATSA et al, 2006).

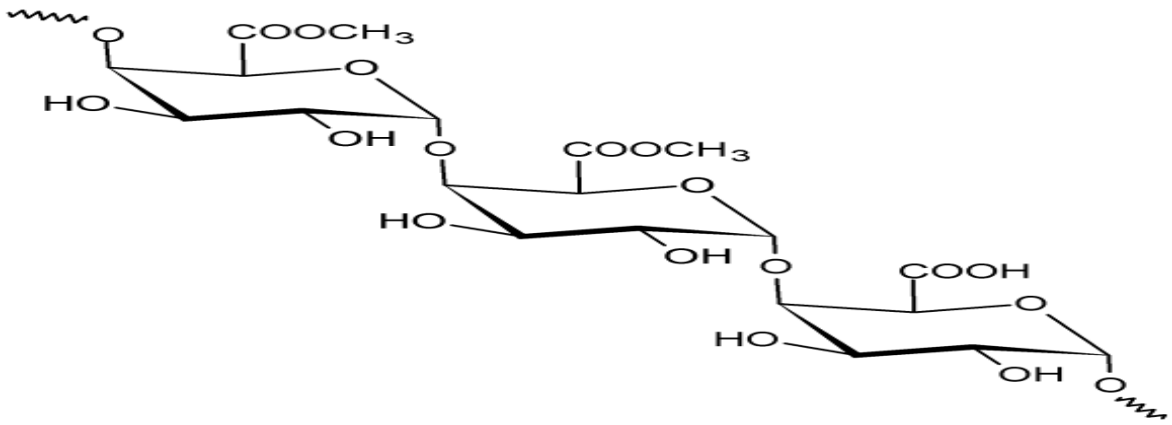


Figura 6: Poli α-(1→4) (ácido D-galacturónico) parcialmente esterificado com grupos metilo (também designado por Poli α-(1→4) (metil galacturonato)). (THAKUR et al, 1997).

O grau de esterificação das pectinas (GE) é o parâmetro que mais influência tem nas suas propriedades funcionais, tendo uma importância fundamental na sua solubilidade e nas suas condições de gelificação. Por esta razão as pectinas comerciais são classificadas em duas categorias, de acordo com o seu grau de esterificação: Pectinas de elevado grau de esterificação - pectinas EGE- quando estas têm um GE superior a 50%, e pectinas de baixo grau de esterificação - pectinas BGE- para as pectinas de com um GE inferior a 50% (RIBEIRO & SERAVALLI, 2007).

As pectinas comerciais são quase exclusivamente obtidas a partir dos resíduos de frutos cítricos (limão, laranja e lima) e de maçã, os quais se encontram disponíveis em grandes quantidades enquanto subprodutos da indústria alimentar (MC CREADY apud PAIVA et al, 2009). Industrialmente são ainda produzidas as chamadas pectinas amidadas, onde partes dos grupos éster são substituídas por grupos amida, sendo o grau de amidação (GA) resultante definido como a razão entre as unidades de ácido galacturónico amidadas e as unidades de ácido galacturónico totais. Normalmente este tipo de pectinas é produzido a partir de pectinas com elevado grau de esterificação, resultando em pectinas com GE menor de 50% e GA entre 10% e 25%, sendo por esta razão designadas por pectinas amidadas de baixo grau de esterificação (ROLIN, 2002).

As pectinas são muito utilizadas pela indústria alimentar na preparação de uma grande variedade de produtos. Uma das razões desta extensa utilização advém da sua capacidade para formar géis físicos em meio ácido, na presença de íons divalentes ou de açucares. A gelificação das substâncias pectidícas pode ocorrer por dois mecanismos diferentes, sendo o mecanismo dominante na formação de um gel de pectina determinado pelo grau de esterificação (ROLIN, 2002).

As pectinas de elevado grau de esterificação gelificam a um pH inferior a 3.8 e na presença de sólidos solúveis (tipicamente açucares) numa concentração superior a 55% (m/m). Estas condições promovem as interações entre as moléculas de pectina, permitindo a formação e estabilização de zonas de junção, quer por meio da formação de ligações de pontes de hidrogênio entre os grupos –COOH e OH, quer pelo estabelecimento de interações hidrofóbicas entre grupos metilo (RINAUDO, 2009).

As pectinas de baixo grau de esterificação, amidadas ou não, apresentam um mecanismo de gelificação completamente diferente e que requer um pH superior a 3 e a presença de uma quantidade suficiente de íons metálicos di- ou tri-valentes (ROLIN, 2002; RINAUDO, 2009). O processo de gelificação deste tipo de pectinas é semelhante ao que ocorre na gelificação do alginato, sendo descrito por um modelo denominado de *egg box* (GRANT et al, 1973 apud RINAUDO, 2009).

A pectina pode formar complexos com outros polímeros, em função de seu balanço de cargas, que se apresenta positivo em pHs elevado e negativo em pHs baixo. Devido a essas características eletrostáticas e de formação de géis, a pectina intacta ou modificada e pectina associadas a outros polímeros naturais ou sintéticos tem sido avaliada como material de revestimento de formas farmacêuticas/sólidas, sistemas matriciais, e mais recentemente, como sistemas microparticulados. WONG et al (2007), preparavam microesferas de pectina por gelificação ionotrópica, visando uma liberação controlada dos fármacos sulfanilamida, a sulfaguanidina e sulfatiazol. Os fármacos menos solúveis (sulfaguanidina e sulfatiazol) proporcionaram maior rendimento de encapsulação.

A utilização das pectinas na produção de bebidas lácticas acidificadas ou fermentadas, como no caso dos iogurtes líquidos que envolve a interação entre este polissacarídeo e as proteínas do soro do leite é outra das grandes aplicações na indústria alimentar, encontrando-se esta aplicação em rápido crescimento (LIU et al, 2007).

As indústrias farmacêuticas e de produtos de higiene pessoal são responsáveis pelo consumo da restante produção de pectinas (cerca de 6% da produção total), utilizando estas na produção de cosméticos, loções, pasta de dentes, produtos para os cabelos e pele e ainda compressas para o tratamento de feridas e sacos coletores para doentes ostomizados (SANTI et al, 2014).

4.3.4.4 Carboximetilcelulose

A Carboximetilcelulose (CMC), obtida através da reação da celulose com monocloroacetato de sódio, é um hidrocolóide que contribui para formação de gel, na retenção de água, além de apresentar propriedades de polieletrólito (KÄISTNER, 1997). A

presença de substituintes com grupos –CH2-COOH na cadeia e celulose produz um afastamento das cadeias poliméricas e permite uma maior penetração de água, conferindo a CMC solubilidade em água a frio. A estrutura da CMC é baseada no polímero de β-(1,4)-D-glucopiranose da celulose (Figura 7)

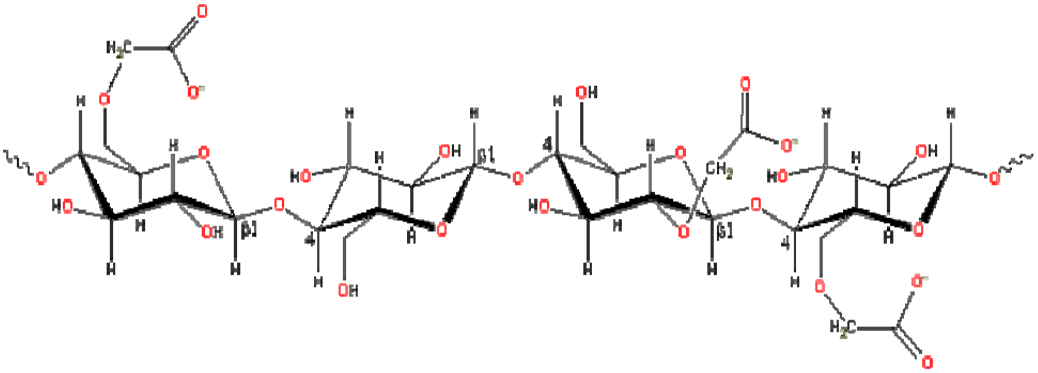


Figura 7 – Molécula da Carboximetilcelulose (KÄISTNER, 1997).

A Estrutura da celulose permite substituição de três grupos hidroxilas em cada molécula de glucose. Entretanto, um grau de substituição de 0,9 grupos OH/glucose é suficiente para conferir as propriedades desejadas. Devido as suas propriedades, tais como: solubilidade na água fria e quente, aumento da viscosidade na solução, habilidade para formar filme, adesividade, características de suspensão, retenção da água, resistência a óleos, gorduras e solventes orgânicos, o CMC tem uma ampla aplicação, tanto na formulação de muitos produtos alimentícios, quanto no melhoramento de seus processamentos. (PILIZOTA et al, 1996; ULUDAG et al, 2008).

Em soluções diluídas, as moléculas de CMC apresentam-se, na maior parte, estendidas (*rod-like*), devido à repulsão eletrostática presente ao longo da cadeia principal do polímero, apresentando um maior raio hidrodinâmico. Em soluções concentradas, as moléculas de CMC se enovelam, ocorrendo o emaranhamento, alcançando a forma de gel termo reversíveis (KÄISTNER, 1997).

Os derivados de celulose, solúveis em água, caracterizam-se por serem compostos que apresentam aplicações tecnológicas importantes. A maior parte deles é substituída ionicamente e, dependendo do grau de substituição do polímero, pode conferir à estrutura, propriedades físico-mecânicas especificas para uma determinada aplicação. Por exemplo, a carboximetilcelulose (CMC), pode ser utilizada como um agente floculante ou espessante em várias aplicações, dependendo do grau de substituição dos seus grupos carboxílicos (KÄISTNER, 1997; ULUDAG et al, 2008).

A densidade de carga dos compostos de CMC depende do grau de substituição nas reações de modificação da celulose e isso tem uma influência direta nas propriedades

macroscópicas da solução. Em soluções diluídas, os polieletrólitos estão em uma conformação estendida por causa da repulsão eletrostática dos seus centros carregados. Para CMC com elevados pesos moleculares, os autores verificaram que os tempos de relaxamento estão associados ao movimento da cadeia principal do polímero que apresentam conformação em ziguezague, também conhecido como estruturas "*worm-like*" (BIRD, 2005; ULUDAG, 2008).

A CMC é largamente utilizada em diversas indústrias, como a têxtil, farmacêutica, química e de alimentos. Sua aplicabilidade se dá em função de suas propriedades funcionais: gelificante, emulsificante, estabilizante e formadora de filmes. Na indústria farmacêutica, é normalmente utilizada para promover maior solubilidade a drogas hidrofóbicas (FEDDERSEN & THORP, 2007). Além disso, existem relatos sobre seu uso na imobilização de células (ULUDAG et al, 2008) e enzimas (DALLA-VECCHIA et al, 2005).

4.4. Ecologia Microbiana Molecular.

Em função do grande avanço tecnológico, foi possível verificar que o conhecimento acerca da biodiversidade microbiana existente no planeta é praticamente insignificante. Esta falta de conhecimento se deve em grande parte ao fato de que os microorganismos precisam ser cultivados para serem caracterizados. Sabe-se hoje em dia que apenas uma pequena fração dos microrganismos presentes no meio ambiente (0,1- 10%) podem ser cultivados por técnicas convencionais (ROSADO,1997; WATANABE et al, 2001).

Recentes avanços nas técnicas de biologia molecular, somados aos grandes desenvolvimentos que vem ocorrendo na área de bioinformática, produziram uma renovação na microbiologia ambiental, constituindo uma nova área que tem sido referida como Ecologia Microbiana molecular (FRANCO et al, 2006).

Neste contexto, a utilização de técnicas moleculares vem se tornando de extrema importância para o estudo da ecologia microbiana, pois nos permite adquirir informações sobre os microrganismos cultiváveis e os não cultiváveis presentes nas amostras.

4.4.1 Extração de ácidos nucléicos a partir de amostras ambientais

O conhecimento da diversidade microbiana é essencial para entender a relação entre os parâmetros ambientais e o funcionamento dos ecossistemas. Com o avanço da biologia molecular e o uso dessas novas técnicas no estudo da ecologia de microrganismos, é possível identificar grupos filogenéticos, determinar a variação espacial e temporal de espécies de microrganismos e elucidar o funcionamento e atividade das comunidades microbianas diretamente em amostras coletadas no ambiente, sem a necessidade de cultivo (WATANABE & HAMAMURA, 2003).

A técnica consiste na amplificação do número de uma determinada sequência específica, definida por iniciadores também específicos, a partir do DNA total, seja de um determinado organismo, seja de uma amostra ambiental. O mecanismo de funcionamento da PCR (figura 8) é baseado em dois componentes principais, os iniciadores, também conhecidos como "primes", que vão ligar ao genoma por homologia de sequência definindo qual região do mesmo que deverá ser copiada, e a enzima DNA polimerase que é responsável pela realização da reação adicionando os desoxiribonucleotídeos a nova fita a ser sintetizada. E essa atividade enzimática se tornou responsável pelo próprio nome da técnica, reação da polimerase em cadeia (ou "Polymerase Chain Reaction") – PCR (FRANCO et al, 2006).

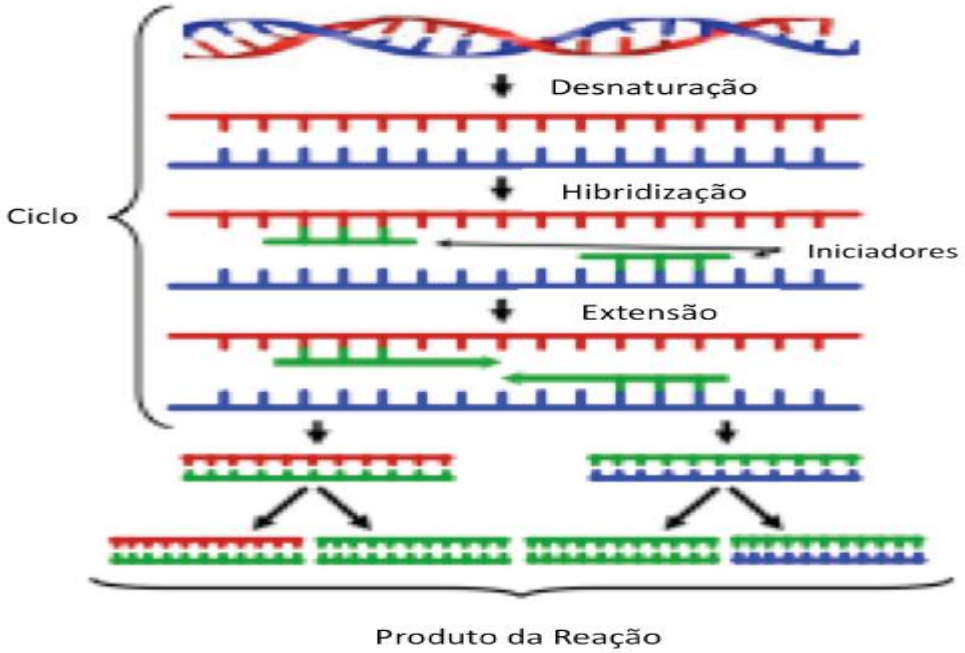


Figura 8: Dinâmica da PCR. Esquema representativo do princípio da reação da polimerase em cadeias (PCR) (TAKETANI, 2010).

O uso de 16S rRNA tem grande significância na identificação e análise filogenética de bactérias, uma vez que este gene é estável ao longo do tempo, e específico para classificação a nível de espécie. Este gene possui características fundamentais que possibilitam sua utilização em estudos de ecologia, tais como: presença de regiões com seqüência de nucleotídeos hipervariáveis entre regiões conservadas; presença em todos os procariotos; a ausência aparente de transferência genético lateral e tamanho considerado satisfatório, de cerca de 1500 nucleotídeos, para estudos filogenéticos (WATANABE et al, 2001). Utilizando a técnica de qPCR vários grupos e espécies de bactérias têm sido alvos de quantificação (ZHANG & FANG, 2006). Sistemas de detecção e quantificação de diversos grupos de microrganismo, funções ecológicas e metabolismos específicos têm sido abordados na literatura (AN et al, 2006; POWELL et al, 2006; ZHANG & FANG, 2006).

Existem diversas técnicas para extração de DNA a partir de amostras ambientais, entretanto, nenhum método é universalmente aplicável, já que cada tipo de amostra, devido à sua própria natureza, requer a otimização de um método próprio (SCHENNEEGURT et al, 2003). Basicamente, a extração de DNA a partir de amostras de água envolve a filtração em membranas e a extração segue a partir do material que fica retido nas mesmas. Já para amostras de sedimento, o material geralmente é macerado para que ocorra a ruptura das células microbianas e liberação do material genético.

4.4.2 DGGE(Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturantes)

Entre as técnicas moleculares baseadas no 16S rRNA, destaca-se o DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante), que fornece um perfil da diversidade microbiana da amostra ambiental (ROSADO, 1997).

Esta técnica identifica diferenças estabelecidas no comportamento desnaturante da dupla fita de DNA que, submetida a um gradiente crescente de concentração de agentes desnaturantes (uréia e formamida), se separam em fragmentos discretos, chamados domínios de desnaturação. São amplicons de DNA com mesmo tamanho, mas com composição diferente, em pelo menos um par de bases, que migram para posições diferentes no gel, gerando assim um perfil genotípico da comunidade, conforme apresentado na figura 9 (ROSADO, 1997; FRANCO et al, 2006). A maior limitação da técnica é que seqüências muito grandes não podem ser eficientemente separadas. O PCR não deve ultrapassar 500 pb, o que acaba limitando as informações para inferências filogenéticas (MUYZER et al, 1998).

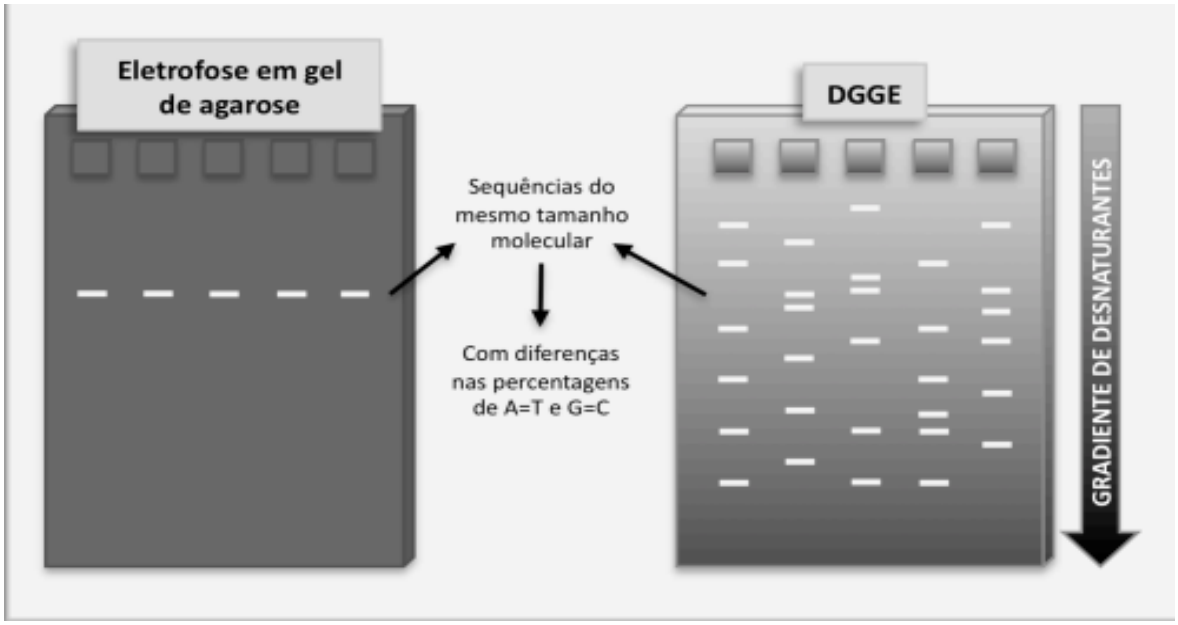


Figura 9: Esquemas do comportamento das bandas de DNA no gel de agarose e DGGE (TAKETANI, 2010).

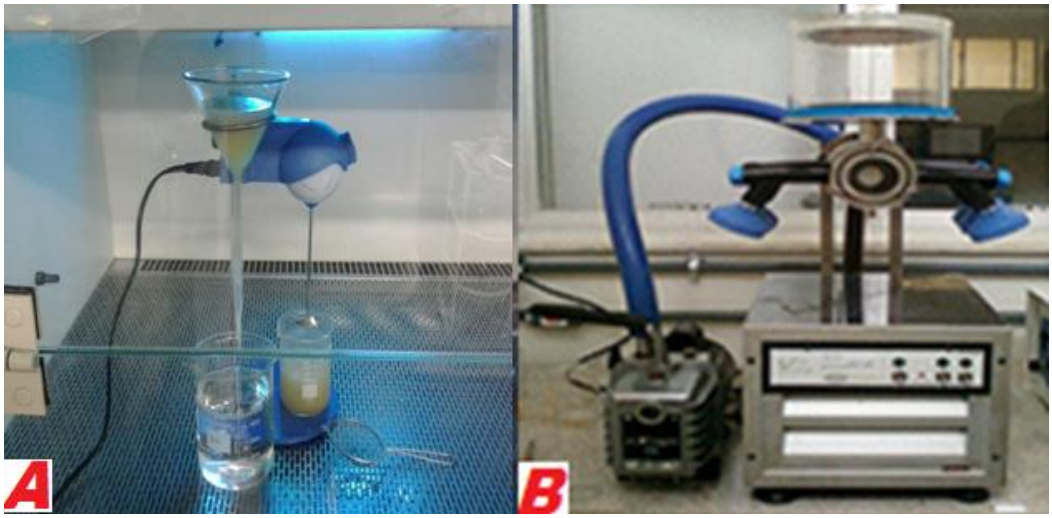
O DGGE vem sendo aplicado para estudar diversidade de diferentes grupos de microrganismos em diversos habitats (MUYZER et al, 1998). Murray et al (1996), usaram DGGE de fragmentos 16S rRNA para comparar a diversidade filogenética de comunidades bacterioplanctônicas de dois estuários e concluíram que as comunidades apresentaram diferenças na composição das espécies, provavelmente em função, da disponibilidade de diferentes tipos de substrato orgânico. Vieira et al (2007), utilizaram bibliotecas genômicas e DGGE para caracterizar a diversidade na comunidade arqueoplânctônica em quatro habitas representativos dentro e próximo à Baía de Guanabara. Através da abordagem molecular, foi possível mostrar que a comunidade é composta por diferentes taxa e que a distribuição das espécies pode estar relacionada à concentração dos nutrientes e aos níveis de poluição.

Capítulo 5

MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 PRIMEIRA ETAPA: Obtenção dos Encapsulados.

A primeira etapa deste trabalho visou a imobilização de nutrientes em diferentes matrizes empregando-se dois tipos de processos de imobilização: técnica de gelificação iônica (figura 10a) e liofilização (figura 10b).



Figuras 10a,b : Ilustração dos processos de obtenção de encapsulados por métodos de gelificação iônica (a) e por liofilização(b).

5.1.1 Materiais usados na 1ª etapa.

As fontes de fósforo na forma de sais de fosfato monopotássico e dipotássico e a fonte de nitrogênio na forma de nitrato de amônio foram dissolvidas em água e acrescentadas a cada matriz polimérica de alginato, carboximetilcelulose, pectina cítrica (todos provenientes da indústria proquímios) e Capsul® (amido modificado da empresa National Starch and Chemical Corporation dos Estados Unidos). Os nutrientes foram empregados nas concentrações de 1g/L de cada sal, totalizando 350 mg/L de nitrogênio e 405 mg/L de fósforo e os polímeros nas concentrações descritas a seguir.

5.1.2 Elaboração do produto de liberação lenta.

Com os materiais acima foram produzidos quatro tipos diferentes de imobilizações, denominado matrizes:

Matriz A: composta por fonte de nitrogênio e fósforo, 3% alginato (p/v) e 4% de Capsul® (p/v), formando uma solução homogênea e posteriormente gotejada em solução de cloreto de cálcio a 0,3M, com tempo de cura de 15min de duração e culminando com a formação de esferas. A seguir foi retirada a umidade do produto gerado a uma temperatura de 60º C.

Matriz B: composta por fonte de nitrogênio e fósforo, 3% alginato (p/v), formando uma solução homogênea e posteriormente gotejada em solução de cloreto de cálcio a 0,3M, com tempo de cura de 15min de duração e culminando com a formação de esferas. Esse produto foi também posteriormente seco em estufa a 60º C.

Matriz C: composta por fonte de nitrogênio e fósforo e 1% de Carboximetilcelulose, formando uma solução que foi submetida ao processo de liofilização, num liofilizador de bancada da marca Enterprise I terroni, dando origem a produto de liberação lenta.

Matriz D: composta por fonte de nitrogênio e fósforo e 1% de pectina cítrica, formando uma solução que foi submetida ao processo de liofilização, no mesmo liofilizador utilizado para construção da matriz C, dando origem a produto de liberação lenta.

5.1.3 Estudo cinético de liberação dos nutrientes

Com o objetivo de verificar se houve liberação dos nutrientes imobilizados, cada matriz produzida acima, foi colocada em duplicata em frascos de vidro de 250ml, contendo 200ml de água destilada estéril e realizada coletas nos seguintes tempos: 0, 1, 4, 8, 15, 35 e 51 dias conforme o esquema abaixo (figura 11):

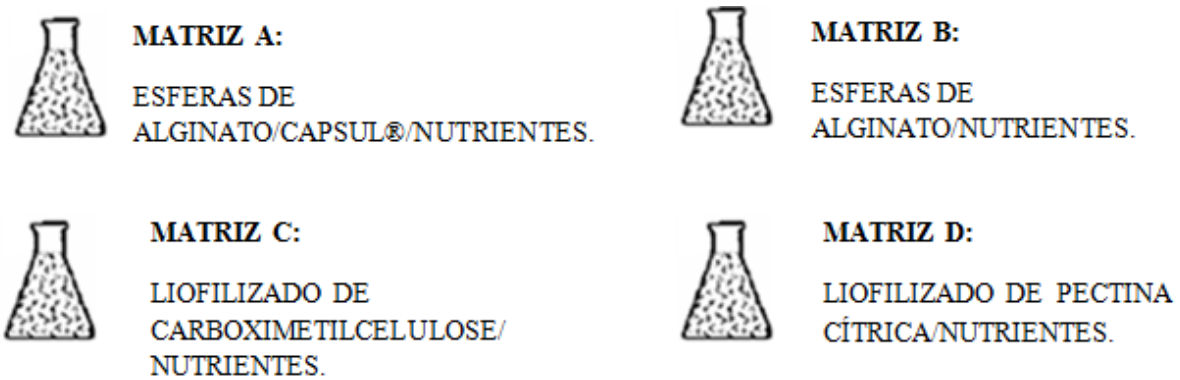


Figura 11: Esquema de organização experimental da 1ª etapa.

5.1.4 Determinações Analíticas

As análises de nitrogênio foram feitas com auxílio do kit doles 500® , para determinação de íons amônio e sua leitura realizada no espectrofotômetro UV/vis da Bioespectro, gerando um valor de absorbância em cada leitura.

Para poder relacionar as absorbâncias obtidas pelas amostras com a concentração de nitrogênio presente no íon amônio, foi construída uma curva padrão com NH_4CL (cloreto de amônio), gerando uma curva de absorbância versus concentração de amônio que posteriormente foi convertido em nitrogênio.

As análises de fósforo foram feitas com auxílio do kit Merck® para determinação de ortofosfato e sua leitura foi realizada no mesmo espectrofotômetro utilizado para ler as amostras de nitrogênio.

Para relacionar a absorbância das amostras com a concentração de fosfato, foi construída a curva padrão de K_2HPO_4 (fosfato de potássio dibasico anidro), o que resultou em uma curva de Absorbância versus Concentração de fosfato que foi posteriormente convertida em fósforo.

5.2 SEGUNDA ETAPA: Avaliação do processo de bioestímulo utilizando os encapsulados.

Esta etapa visou a compreensão da bioestimulação dos microrganismos, a partir da utilização do encapsulado de aliginato/capsul® e sais minerais utilizados na 1ª primeira etapa. Para isso foram realizados experimentos formados por sistemas líquidos compostos de meio mineral modificado e 2 % (m/v) de glicose. O meio mineral foi baseado em Reis et al (2010), em que as fontes de nitrogênio e fósforo foram substituídas pelo imobilizado eleito na primeira fase deste experimento, sua composição está representada na tabela 2.

Tabela 2: Composição do meio mineral modificado (Reis, 2009)

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (g/L)
SULFATO DE MAGNÉSIO	0,2
CLORETO DE CÁLCIO	0,02
N e P IMOBILIZADO EM MATRIZ POLIMÉRICA.	AS MESMAS CONCETRAÇÕES DE N e P DO MEIO BUSHNELL-HASS.
CLORETO DE FERRO III	0,05

Em paralelo foram feitos ensaios com produto de liberação lenta comercial Osmocote® 10-10-10 e o próprio meio Bushnell Hass (provenientes da empresa Sigma), já que este possui nutrientes livres no meio, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Composição do meio mineral Bushnell-Hass

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (g/L)
SULFATO DE MAGNÉSIO	0,2
CLORETO DE CÁLCIO	0,02
FOSFATO MONOPOTÁSSICO	1,0
FOSFATO DIPOTÁSSICO	1,0
NITRATO DE AMÔNIO	1,0
CLORETO DE FERRO III	0,05

Todos os experimentos foram realizados em frascos de vidros de 500 ml contendo 200 ml de meio líquido, em sistemas estáticos, com inoculação de *Pseudomonas sp*. obtida de um ambiente marinho com histórico de contaminação por hidrocarbonetos, adquirido no laboratório de Microbiologia Industrial da UFRJ. A cepa após crescida em caldo nutriente, foi mantida em refrigerador e a cada inóculo foi transferida para um novo caldo nutriente estéril cultivado a 30°C por 24 h. O inóculo inicial empregado foi de 5 ml para cada 100 ml de volume dos meios experimentais do sistema de bioestímulo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata por um período de 96 h, sendo retiradas amostras nos intervalos de 0, 24, 48 e 96 h e analisados as concentrações de fósforo, nitrogênio amoniacal, através dos "kits" colorimétricos mencionados na primeira etapa. Também foi analisada nesta etapa a glicose usando "kit" colorimétrico da empresa Doles® e proteínas totais pelo método de Lowry. Segundo Zaia et al (1997), este método é recomendado por muitos autores em estudos comparativos de determinação de proteínas por permitir com menor quantidade de amostra melhor sensibilidade, exatidão nos resultados. As curvas de calibração foram feitas a partir de soluções de glicose e Albumina do Soro Bovino (BSA) para as quantificações do açúcar e da proteína respectivamente.

5.3 TERCEIRA ETAPA

5.3.1 Determinação da melhor relação de nitrogênio e fósforo e aplicação do produto de liberação lenta em microcosmo

A partir da bioestimulação verificada na segunda etapa, foi realizada a terceira etapa em microcosmo para avaliação da melhor proporção de nitrogênio e fósforo na matriz escolhida para ser empregada como fonte de nutrientes na biorremediação de água marinha contaminada por óleo combustível MF-380, para isso foi empregado o planejamento Fatorial completo, com auxílio dos *softwares statística 7.0*. que gerou cinco combinações de diferentes concentrações de N e P, baseado em valores destes nutrientes utilizados na literatura (MILLIOLI et al, 2007; REIS, 2009), conforme apresentado na tabela 4.

Esta técnica é bastante utilizada quando se tem duas ou mais variáveis independentes e se deseja medir os efeitos ou influências de cada variável na resposta de um processo (CALADO e MONTGOMERY, 2003

Tabela 4: Matriz escalonada da otimização do produtode liberação lenta construída no *software Statístic 7.0*.

Experimentos	Variável Nitrogênio	Variável Fósforo
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	-1	-1
7	+1	-1
8	-1	+1
9	+1	+1
10	0	0

❖ Para concentração do nitrogênio: 10 (-1), 15 (+1) e 12,5 (0); concentração de fósforo: 1(-1), 10 (+1) e 5,5 (0) (Reis et al, 2009; Millioli et al, 2007).

Em cada experimento foi utilizado 6g de alginato de sódio, 8 g de capsul® e aproximadamente 200mL de água destilada, produzidos a técnica de gelificação iônica apresentado na 1ª etapa deste trabalho. A quantidade de sais utilizada em cada experimento está discriminada na Tabela 5.

Tabela 5: Massa total dos sais utilizados em cada experimento nas cápsulas de liberação lenta.

Composto	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5
Nitrato de Amônio	1,164 g	1,164 g	1,752 g	1,752 g	1,440 g
Fosfato Monopotássico	0,086 g	0,792 g	0,0864 g	0,792 g	0,432 g
Fosfato Dipotássico	0,110 g	0,996 g	0,110 g	0,998 g	0,552 g

O experimento foi conduzido em frascos de vidro de 500 ml contendo 200 ml de água do mar, coletada na Praia do Galeão, localizada no bairro da Ilha do Governador, cidade do Rio de Janeiro (figura 12), e contaminada com 0,2 % (m/v) de óleo combustível MF-380.

A escolha da água foi baseada em estudos realizados anteriormente que mostram que locais onde ocorrem frequentes vazamentos criam uma biota que possui uma "memória biológica" tornando mais eficaz a remoção de contaminantes (MENEGHETTI,2007). Portanto, a microbiota previamente exposta é capaz de biodegradar diferentes frações do óleo derivado de petróleo, tornando maiores as chances de que ocorra a degradação do óleo combustível.

A faixa de pH ideal para que microrganismos apresentem atividade máxima está entre 6,5 e 8,5 (ANDRADE et al.,2010). Como o pH da água utilizada foi de 8,3 pode-se concluir que o pH está adequado para que o processo de biorremediação aconteça. A quantidade de nitrogênio total na água foi de 8,3 mg/L e de fósforo total 1,3 mg/L.

Figura 12: Localização da área de coleta de amostras para realização do experimento de bioestímulo em microcosmo.

Os frascos foram mantidos de modo estático no laboratório a temperatura média de 27°C por 30 dias. Com o intuito de se obter resposta mais completa, foi realizado em paralelo um experimento com o produto comercial Osmocote® e um experimento de atenuação natural, em que não foi adicionado nenhum produto.(figura 13).

Os experimentos foram conduzidos em duplicatas e organizados 7 ensaios diferentes conforme o resultado do planejamento experimental.

Os intervalos das coletas das amostras foram de 0, 15 e 30 dias, tendo sido utilizado quatro frascos em cada amostra, totalizando 12 frascos para cada experimento em microcosmo. Nesta etapa foram quantificados nitrogênio total, fósforo, proteínas totais, HTP e também analisado o perfil da comunidade bacteriana.

Figura 13: Ilustração da montagem do experimento da etapa final.

5.3.2 Determinações analíticas da etapa final

5.3.2.1 Dos nutrientes

As análises de nitrogênio total foram feitas no equipamento TOC VCP Total Organic Carbon, modelo Shimadzu TNM-1. As análises de fósforo e de proteína foram feitas de acordo com o mesmo protocolo utilizado na segunda etapa deste trabalho, ou seja, com auxílio do kit comercial para determinação de ortofosfato quando se tratar de fósforo e o método de Lowry, para evidênciar a quantidade de proteína total.

5.3.2.2 Os hidrocarbonetos

Foi realizada a avaliação da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) através da extração de óleo das amostras, de acordo com o protocolo baseado no método 1664 da Environmental Protection Angência (EPA) seguida de análise no equipamento TOG/HTP Analyzer Infracal, (modelo HART-T da Wilks Enterprise), que é um modelo portátil capaz de quantificar óleos e graxas totais / HTP por espectrofotometria de infravermelho (Figura 14). A quantificação das amostras foi feita após curva de calibração a partir do óleo utilizado nos experimentos nas dependências laboratoriais do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM).

Figura 14: Aparelho TOG/HTP Analyser, usado para quantificar Hidrocarbonetos Totais do Petróleo.

Segundo Nascimento et al, (2003), a determinação dos HTPs são feitas através da leitura por infravermelho, baseada na medida da absorbância da ligação C-H dos hidrocarbonetos. Estas ligações alifáticas absorvem energia num comprimento de onda específico e a intensidade de absorção é proporcional a quantidades de moléculas de hidrocarbonetos numa amostra.

A escolha deste método tem sido abordado em vários estudos de análise de degradação do HTP (TAKETANI et al 2010, REIS, 2009), por ser uma técnica rápida, barata e por apresentar resultados melhores do que o método gravimétrico e resultados bem próximos a técnica de cromatográfica. (TELHADO et al 2009). Todas as análises descritas nesta etapa foram feitas em duplicata.

5.3.3 Da diversidade microbiana

5.3.3.1 Extração de DNA dos sistemas de tratamento

A extração de DNA foi realizada pelo uso de um Kit de extração de solo (FastDNA® SPIN Kit for Soil) da BIO101 (Califórnia, EUA) que utiliza o método da extração direta. A extração do DNA foi feita a partir do recorte da membrana de 0.22µm pelo qual foram filtradas 200 ml da amostra (TAKETANI et al 2003). A qualidade e a pureza do DNA obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). Amostras de DNA (5 µL) foram misturadas com 5 µL de corante para eletroforese e aplicadas nos géis. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 90V em tampão TBE 0,5x pelo período de 1,5 horas e, em seguida, foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz U.V. em um sistema de captura de imagem (IMAGO, B & L Systems).

5.3.3.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Após a constatação da pureza das amostras por eletroforese, estas foram submetidas a uma reação de amplificação do fragmento do gene *rrs* que codifica para o rRNA 16S utilizando os seguintes iniciadores: U968f-GC ("grampo" + 5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3') e L1401r. (5' GCG TGT GTA CAA GAC CC 3'(Nubel et al. 1996). O iniciador U968f é homólogo a região 968-984 do gene rDNA de *Escherichia coli*, enquanto que o iniciador L1401 é homologo a região 1385-1401 deste mesmo gene. Estes iniciadores amplificam a região da alça V6-V8 do RNA ribossomal, que é mais variada do que as outras regiões descritas na literatura (WATANABE et al. 2001).

As misturas foram feitas para um volume final de amostra de 50 µL e as concentrações de cada reagente estão apresentadas a seguir na tabela 6.

Tabela 6: Concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR – 16S (U968-L1401).

Reagente	Concentração Final no tubo
Tampão	10 x (Invitrogen)
$MgCl_2$	2,5 mM
dNTPs	2,5 mM
Primer Forward	25pmol/ 50µL
Primer Rverse	25 pmol/50µL
BSA	20µg
Formamida	0,5µL
Taq	2,5U/50µL (Invitrogen)

*Em cada reação foi aplicado 4ng de DNA ambiental.

O programa de PCR utilizado compreende um ciclo de desnaturação das fitas de DNA por 3 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55ºC e 1 min a 72°C, e da extensão a 72°C por 10 min (TAKETANI et al 2003).

5.3.3.3 DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes)

O experimento com DGGE foi realizado com uma unidade DGGE da Bio-Rad (Richmond, USA). Os produtos de PCR a serem analisados foram aplicados diretamente no gel contendo 6% (P/V) de poliacrilamida e 0.5 x TAE (20 mM Tris-acetato [pH 7.4], 10mM de acetato de sódio, 0.5mM EDTA). O gradiente de 45% e 65% foi formado a parir de soluções

estoque de poliacrilamida (6%) contendo 0 a 100% de desnaturantes (100% correspondem a 7M de uréia e 40% de formamida deionizada com resina AG501-X8 Bio-Rad, Inc). O tempo de eletroforese foi de 16 h a 60 ^{o}C e 75V.

Após a eletroforese, o gel foi corado por 40 min com SYBR Gold I (Molecular Probes) e digitalizado em sistema de captura de imagem STORM (Pharmacia, Amersham). Para a análise do gel de DGGE foi montado um dendrograma baseado nos perfis de bandas observados utilizando-se o coeficiente de similaridade de Pearson e o método de agrupamento UPGMA, através da utilização do software Bionumerics v 6.6 (Applied Maths, BE).

Capítulo 6

RESULTADOS E DISCUSSÕES.

6.1 Obtenção dos Encapsulados de Nitrogênio e Fósforo – Primeira Etapa.

6.1.1 Aspectos estruturais dos encapsulados

A combinação entre fosfato monopotássico, fosfato dipotássico e nitrato de amônio e a matriz de alginato/capul® submetidas ao gotejamento em solução de cloreto de cálcio (método de gelificação iônica), originou esferas que foram submetidas ao processo de retirada de umidade (figura 15), assim como a matriz composta somente por alginato, fosfatos mono, dipotássicos e nitrato de amônio.

Figura 15: Ilustração das esferas de alginato/capsul® com N e P imobilizados, obtidas antes e após secagem, pela técnica de gelificação iônica.

O processo de aprisionamento pelo método de geleificação iônica possibilitou a formação do encapsulado esférico tanto na matriz formada somente por alginato, como pela matriz composta por alginato/capsul®, demonstrando que em ambos os casos os polímeros utilizados permitiram a imobilização dos nutrientes desejados. Estes resultados também foram observados por Reis et al (2010), que produziram esferas de alginato/capsul®/NPK líquido conseguindo 31% de nitrogênio e 45% de fósforo imobilizados. Bastos et al (2009), também usaram em seu trabalho os mesmos polímeros alginato de cálcio e capsul® como agente encapsulante e conseguiram produzir filme alimentício com uma boa retenção de vitamina C.

As matrizes composta por pectina cítrica/nutrientes submetidas ao processo de liofilização, assim como a matriz composta por carboximetilcelulose/nutrientes, resultaram em imobilizações das mesmas fontes de nitrogênio e fósforos mencionados acima, porém os aspectos dos encapsulados por esta técnica não apresentaram forma definida, sendo fortemente influenciado pelo recipiente no qual foram depositados, por isso estes mesmos encapsulados foram submetidas ao processo de fragmentação para facilitar suas aplicações em seus respectivos experimentos, como mostrado na figura 16.

Warr et al (2013) pela técnica de encapsulamento também conseguiram desenvolver um fertilizante de liberação lenta a base de argila nutritiva e carboximetilcelulose em seu estudo de biorremediação de derramamentos de óleo em águas oceânicas com baixo teores de nutrientes.

Figura 16: Ilustração da matriz de carboximetilcelulose com imobilizado de nitrogênio e fósforo, obtidos antes e após a fragmentação da matriz, com auxílio da técnica de liofilização.

6.1.2 Perfil de liberação de nitrogênio imobilizado em diferentes matrizes.

Na figura 17 pode-se observar que existiu liberação lenta de nitrogênio, mostrando-nos que durante os 51dias de experimento não houve nenhum caso de liberação total do N imobilizado.

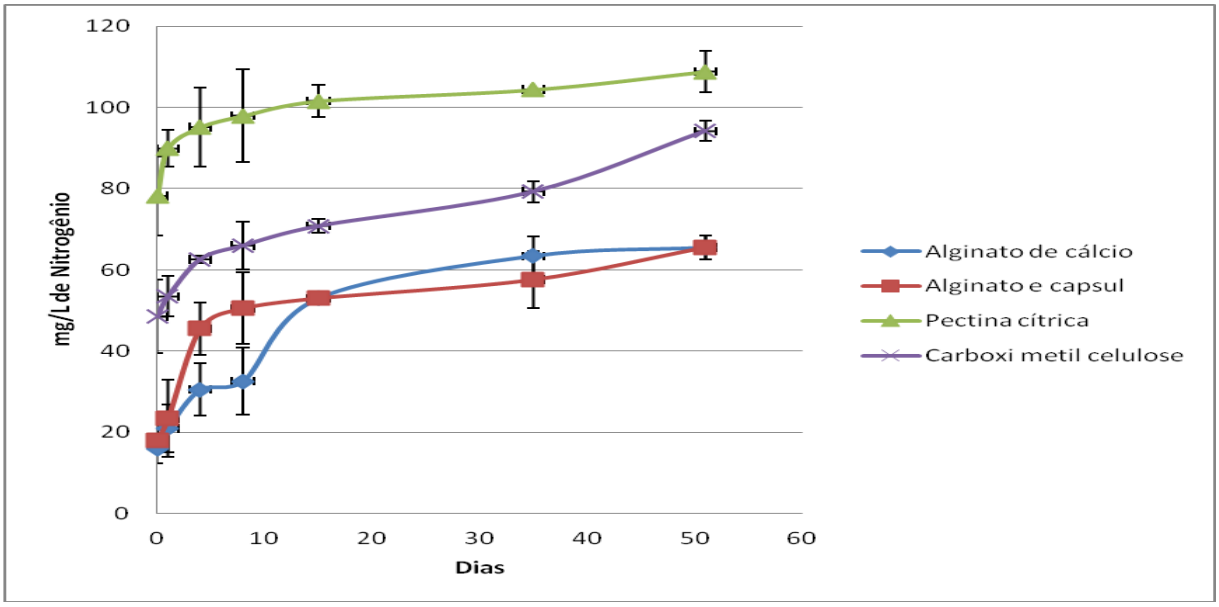


Figura 17: Análise de nitrogênio total liberados em sistema líquido durante 51 dias de experimento analisado.

A imobilização em esfera de alginato de cálcio apresenta uma liberação inicial de 20 mg/L de nitrogênio, nas primeiras horas em contato com o meio líquido, porém observa-se uma fase estacionária entre o 4º e o 8º dia de experimento. Após esse período as esferas compostas de alginato de cálcio voltam a liberar nitrogênio de forma gradual até atingir 65,5 mg/L no decorrer 51 dias de experimento.

A curva de liberação do nitrogênio aprisionado em esferas composta de alginato e capsul®, mostra uma ligeira liberação de nitrogênio nos primeiros dias de experimento saindo de 20 mg/L no tempo inicial alcançando 50 mg/L no 8°dia , no entanto após esse período é observado uma diminuição na liberação de nitrogênio no experimento, porém mesmo assim este sistema de liberação conseguiu alcançar 65,5 mg/L em 51 dias de experimento.

A imobilização de nitrogênio na matriz composta de caboximetilcelulose submetida a técnica de liofilização, mostrou um bom resultado pois é observado no gráfico uma liberação inicial de 48,5 mg/L na primeira hora de experimento, e durante todo o experimento é observado uma liberação gradual de nitrogênio atingindo 94,2 mg/L em 51 dias.

Já a liberação de nitrogênio aprisionado em uma matriz polimérica composta por pectina cítrica e submetida também a técnica de liofilização apresentada no gráfico, mostra uma liberação na primeira hora de experimento de 78,2 mg/L de nitrogênio no sistema, e também apresenta um perfil crescente durante todo o período experimental, este comportamento resultou ao final de 51 dias uma liberação total de 108,8 mg/L de nitrogênio.

6.1.3 Perfil de liberação de fósforo imobilizado em diferentes matrizes.

É observado na figura 18, que existiu liberação de fósforo total, mostrando que durante 51 dias de experimento analisado, assim como para o nitrogênio, o fósforo esteve presente no sistema líquido.

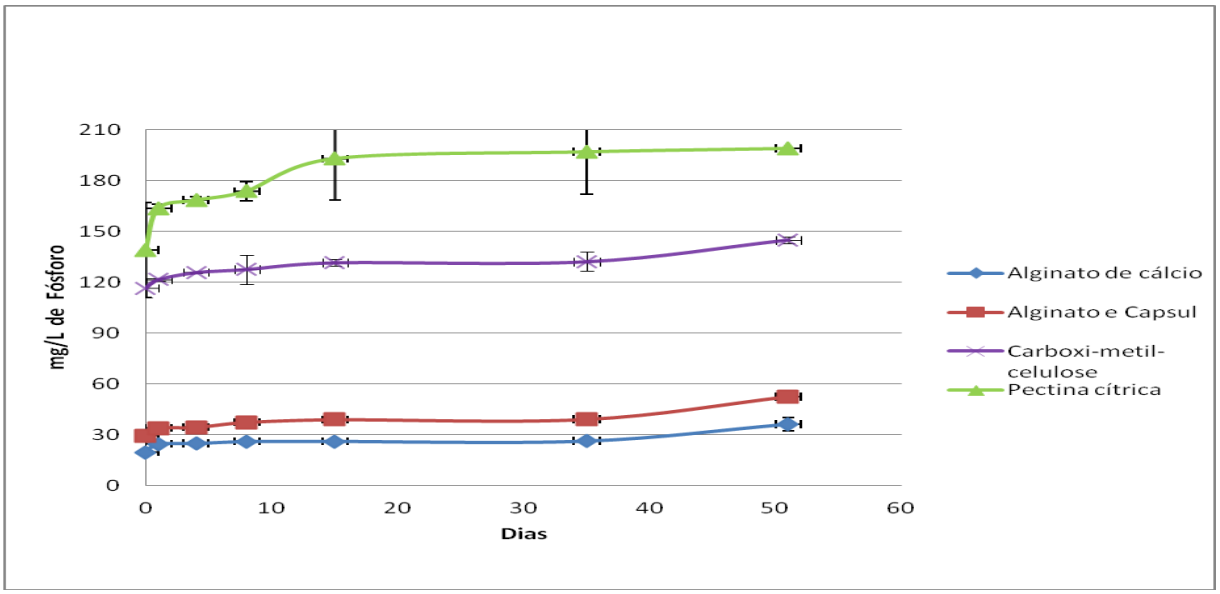


Figura 18: Análise da concentração de fósforo liberado em sistema líquido durante 51 dias de experimento.

O fósforo aprisionado em esferas de alginato de cálcio apresenta um perfil de liberação muito lenta, pois observa-se no gráfico que no instante inicial havia no sistema abaixo de 30 mg/L e foi necessário mais de 35 dias para alcançar uma liberação acima de 30 ppm no sistema líquido, com ausência de microrganismos.

A matriz formada por alginato de cálcio e capsul®, já mostrou resultado semelhante quando comparado a matriz formada por apenas alginato de cálcio, apresentando 30 mg/L de liberação de fósforo no inicio do experimento, mantendo-se um pouco acima durante os primeiros 35 dias, porém após esse período apresentou uma maior liberação de fósforo, chegando a um valor acima de 50 mg/L.

Neste gráfico de imobilização e liberação de fósforo é possível notar que a matriz polimérica formada por carboximetilcelulose e submetida ao processo de liofilização nos fornece uma liberação gradual, porém é observado que ao iniciar o experimento a concentração de fósforo no instante zero é de 120 mg/L, a medida que vai passando os dias a concentração vai aumentando chegando a um valor acima de 130 mg/L em 15 dias e alcança o valor acima de 145 mg/L de fósforo após 51 dias de experimento.

O resultado da liberação de fósforo imobilizado em uma matriz composta por pectina cítrica e submetida ao processo de liofilização apresentou resultados altos quando comparados aos outros polímeros estudados neste trabalho. Porém assim como a matriz de

carboximetilcelulose no instante inicial o valor da concentração é de 140 mg/L de fósforo alcançando 190 mg/L no decorrer de 15 dias de análises, e após esse período não houve liberação, o que acarretou um perfil estacionário até o 51° dia de experimento.

Os resultados apresentados nesta primeira etapa de trabalho são bastante significativos. Segundo Sempeho et al (2014), em seu artigo de revisão, relatam que um produto para ser considerado fertilizante de liberação controlada deve possuir taxas de liberação menor do que um fertilizante prontamente disponível, além de possuir uma taxa de liberação maior que 15% em 24 horas e menor que 75% durante 28 dias, segundo os critérios do Comitê de Normalizações Europeias (CEN). Com isso pode-se afirmar que todas as matrizes produzidas são consideradas fertilizantes de liberação controladas, contudo as matrizes que melhor atenderam o CEN para ambos os nutrientes estudados, foram as matrizes formada por alginato de cálcio e a matriz formada por alginato/capsul.

As taxa de liberação apresentada nas figuras 17 e 18, nos ajudam a compreender melhor o comportamento de liberação dos imobilizados. Apesar de terem as concentrações das fontes de nitrogênio e fósforo imobilizadas bem próximas (350 mg/L de N e 405 mg/L de P), a interação entre os sais envolvidos, o polímero escolhido e a técnica utilizada são variáveis importantes na hora de se obter um produto de liberação lenta também na área ambiental, implicando diretamente no custo de produção e eficiência da técnica (XU, et al, 2005, LIANG et al , 2006).

Foi detectada que a imobilização que melhor atendeu o perfil de liberação lenta destes nutrientes (N e P) foi a matriz composta pela solução formada de alginato de sódio e capsul®, esta composição polimérica usada na formulação deste produto, faz parte da linha de pesquisa do laboratório onde foi desenvolvida a tese mostrando-se promissora na inovação biotecnológica, devido as suas qualidades apresentadas na metodologia, com ela foi capaz de observar uma melhor proteção dos nutrientes encapsulados e disponibilização controlada dos mesmos. Na literatura é reportado por vários autores (COULON et al. 2007; YU et al. 2005) em seus estudos, a necessidade contínua de correção de nitrogênio e fósforo para estimular os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. O resultado obtido é interessante pois, presume-se que ao se trabalha com um consórcio bacteriano este tipo de liberação irá suprir a demanda necessária de nutrientes. Chaineau e colaboradores 2005 observaram em seus estudos, um efeito estimulador da comunidade microbiana degradadora de óleo durante 150 dias, a medida que foi aumentada a concentração de nutrientes adicionados. Esses estudos corroboram para a necessidade do uso do material encapsulado como fonte de liberação lenta para o ambiente a ser tratado, presumindo-se uma redução no custo da biorremediação e aumento da eficiência dos mesmos. Os resultados apresentados na segunda etapa poderão

melhor evidenciar a escolha do produto como agente de liberação lenta na bioestimulação de microrganismo.

6.2 Segunda Etapa - Avaliação do processo de bioestimulação dos imobilizados

O encapsulado eleito na primeira etapa deste trabalho composto de 3% (p/v) de alginato de sódio e 4%(p/v) de capsul®, misturados com os nutrientes, formaram uma solução que ao ser gotejada em cloreto de cálcio, deram origem a pequenas esferas de coloração esbranquiçada que quando submetidas a secagem alcançaram um diâmetro médio de 0,2 mm.

Os resultados apresentados abaixo comparam o produto de liberação lenta produzido com alginato e capsul® como fonte nutricional de nitrogênio e fósforo, com o produto agrícola Osmocote® e o meio mineral Bushnell-Hass.

A Tabela 7 mostra a concentração de nitrogênio amoniacal, fósforo total e glicose ao longo dos experimentos.

Tabela 7: Concentração de nitrogênio amoniacal, fósforo total e glicose ao longo das 96h de experimento

Experimentos	Análises	Tempo			
		0h	24h	48h	96h
Imobilizado de Alginato/Capsul	Glicose (mg/L)	19950 ± 0	19040 ± 640	17200 ± 480	16050 ± 120
	$N\text{-}NH^{4+}$ (mg/L)	23 ± 0	115 ± 1	73 ± 0	72 ± 1
	$P\text{-}PO^{3-}$ (mg/L)	20 ± 0	148 ± 18	152 ±2	165 ± 1
Bushnell Hass	Glicose (mg/L)	20000 ± 0	18220 ± 100	17740 ± 80	17410 ± 10
	$N\text{-}NH^{4+}$ (mg/L)	142 ± 0	44 ± 2	39± 0	38 ± 0
	$P\text{-}PO^{3-}$ (mg/L)	395 ± 0	329 ±9	315 ± 1	315 ± 0
Osmocote®	Glicose (mg/L)	19890 ± 220	15420 ± 140	12240 ± 120	9000 ± 500
	$N\text{-}NH^{4+}$ (mg/L)	9 ± 0	43± 1	37 ± 2	19 ± 2
	$P\text{-}PO^{3-}$ (mg/L)	10 ± 0	98 ±1	117 ± 6	180 ± 2

Pode-se observar na tabela 7 que o imobilizado de alginato/capsul® apresentou no início do experimento uma concentração de 19950 mg/L de glicose, com uma disponibilidade de 23 mg/L de nitrogênio e 20 mg/L de fósforo. Após 24h de experimento a concentração de glicose reduziu para 19040 mg/L, já concentração de nitrogênio e de fósforo no meio

apresentaram aumento, chegando a 115 mg/L e 148 mg/L, respectivamente. Com 48h de experimento observou – se que a concentração de glicose continuou decrescendo, alcançando um valor de 17200 mg/L, no entanto a concentração de nitrogênio livre diminuiu, atingindo 73 mg/L; já concentração de fósforo permaneceu crescente, chegando a 152 mg/L. Ao final de 96h a concentração de glicose apresentou um valor de 16050 mg/L, no entanto a concentração de nitrogênio não apresentou alteração significativa em seu valor, mas o fósforo disponível no meio de cultivo apresentou um aumento em sua concentração, alcançando um valor de 165 mg/L.

Ao analisar o comportamento do experimento composto por Bushnell-Hass, observa-se que no início do experimento a concentração de glicose era de 20000 mg/L, nitrogênio de 142 mg/L e 395 mg/L de fósforo. Com 24 h a concentração de glicose apresentou queda, alcançando o valor de 18220 mg/L. Neste mesmo período é possível observar uma redução na concentração de nitrogênio alcançando um valor de 44 mg/L, seguida de uma queda na concentração de fósforo chegando a 329 mg/L. Após 48h o valor da concentração de glicose apresentou uma diminuição, alcançando 17740 mg/L, isto também foi observado em relação ao valor de nitrogênio disponível, já que este apresentou um valor de 39 mg/L, e também de fósforo com valor na concentração de 315 mg/L. Com 96h de experimento o valor na concentração de glicose apresentou uma pequena queda, já as concentrações de nitrogênio disponíveis e de fósforo não apresentaram alteração.

No experimento realizado com Osmocote®, é possível observar que no início do experimento o valor da concentração de glicose era de 19890 mg/L, a quantidade de nitrogênio no meio era de 9 mg/L e a concentração de fósforo era 10 mg/L. Após 24h a concentração de glicose reduziu significativamente apresentando 15420 mg/L, no entanto o valor de nitrogênio disponível no meio apresentou um aumento, chegando 43 mg/L, assim como a concentração de fósforo, atingindo o valor de 98 mg/L. Com 48h de experimento a concentração de glicose presente no meio continuou declinando, seguido da concentração de nitrogênio disponível no meio que apresentou 37 mg/L, já o inverso na concentração de fósforo disponível foi observado, chegando a 117 mg/L. Ao final de 96h de experimento a quantidade de glicose presente chegou a 9000 mg/L, no entanto a concentração de nitrogênio no meio reduziu, apresentando 19 mg/L, já concentração de fósforo continuou aumentando, atingindo 180 mg/L.

A figura 19 mostra o crescimento microbiano de *Pseudomonas sp.*, expresso através da concentração de proteína no meio de cultivo.

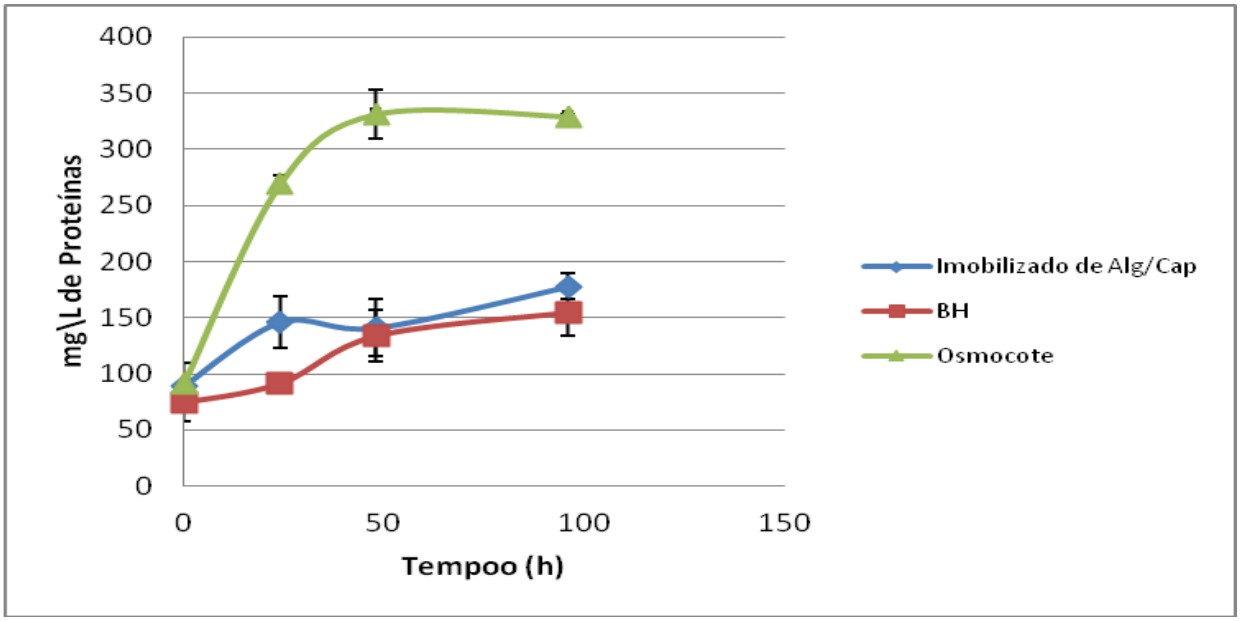


Figura 19: Avaliação de proteína total em sistemas com nutrientes livres e encapsulados em meio mineral na presença de *Pseudomonas sp.*

Nesta figura pode-se observar que o experimento formado pelo imobilizado de alginato e capsul® iniciou o experimento com 89 mg/L, após 24h de experimento este apresentou um aumento na concentração proteica chegando a 146 mg/L. Com 48h o crescimento se manteve estável, porém ao fim de 96h a concentração de proteína apresentou ligeiro aumento alcançando um valor de 178 mg/L.

No experimento em que se empregou o meio Bushnell Hass, a concentração inicial de proteína também apresentou um aumento chegando a 91mg/L em 24h, após 48h esta concentração continuou aumentando apresentando 134 mg/L e com 96 h de experimento a concentração proteica alcançou 155 mg/L no meio de cultivo.

O perfil de crescimento apresentado pelo experimento formado pelo Osmocote®, mostra um crescimento muito significativo após 24h chegando a 269 mg/L de proteínas; em 48h de experimento sua concentração alcançou 331 mg/L, porém este valor se manteve até o final de 96h de experimento.

Visualizando-se os dados da tabela 7 e da figura 19, mostrados acima, pode-se inferir a eficiência da capacidade de liberação das matrizes poliméricas quando comparadas com nutrientes livres para estimulação de microrganismos no meio ambiente.

As análises dos experimentos formados por encapsulados de alginato /capsul®, e Osmocote®, em que a fonte nutricional de nitrogênio e fósforo se encontram retidas nessas respectivas matrizes demonstraram que ao liberarem poucos nutrientes, observado na tabela 7 no instante 0, proporcionou um bom estímulo para o crescimento inicial apresentado na figura 19. Este resultado foi comparado com o experimento empregando-se o meio Bushnell-Hass na

mesma tabela, já que neste caso toda quantidade de nitrogênio e fósforo está disponível no instante inicial, o que não determinou em um bom crescimento microbiano.

Ao visualizar o perfil de crescimento apresentado na figura 19 para o experimento com Osmocote®, observa-se que este obteve um maior ganho proteico quando comparado aos experimentos com Bushnell-Hass e Alginato/capsul®, isto se deve provavelmente a rápida assimilação dos nutrientes num curto período de 24h. Como visualizado na tabela 7, neste período, observa-se neste experimento os menores valores nas concentrações de nitrogênio e fósforo disponíveis no meio.

Estudos realizados por Xu et al (2004) em que foram testados a utilização do fertilizante Osmocote® verificou-se que este aumentou drasticamente as atividades metabólicas dos microrganismos e acelerou a biodegradação dos hidrocarbonetos em solos contaminados por atividades petrolíferas.

Nos resultados apresentados na figura 19 são observados que os experimentos formados por Osmocote® e Alginato/capsul®, representantes da técnica de liberação lenta de nutrientes, obtiveram os melhores resultados como bioestímuladores para o microrganismo *Pseudomonas sp*., já que o primeiro determinou um maior crescimento num intervalo de 48h e o segundo apresentou um perfil crescente de desenvolvimento em termos de concentração proteica em relação ao meio Bushnell-Hass. Isso novamente pode ser comprovado quando se analisa os valores de glicose (tabela 7) onde os mesmos experimentos apresentaram os maiores consumos ao longo de 96h de experimento. Estes resultados foram obtidos possivelmente devido a manutenção da melhor relação de C: N: P no sistema líquido, permitindo melhor crescimento no caso do imobilizado. Swannell et al, (1999), também observaram em experimentos de biorremediação, em que foram comparados a ação de bioestímulo dos microrganismos com auxílio do produto de liberação lenta em relação a aplicação de nutrientes inorgânicos em dose única, que o produto de liberação lenta foi mais eficiente, devido ao melhor aproveitamento dos nutrientes disponíveis.

O produto de liberação lenta formado por Alginato/capsul® mostrou que o crescimento microbiano ainda não entrou em fase estacionária, conforme o experimento formado por Osmocote, como visto na figura 19, e ainda existe uma quantidade de nitrogênio, fósforo e carbono, disponível, o que pode permitir um aumento no crescimento final.

De acordo com os gráficos apresentados e discutidos nesta etapa, é compreensível supor que quando os microrganismos são suplementados com nutrientes essenciais para seu crescimento de forma lenta e equilibrada, pode-se chegar a valores maiores de crescimento, quando comparado ao sistema conduzido com os nutrientes disponibilizados todos ao mesmo tempo inicialmente. Por isso a terceira etapa deste trabalho foi a utilização de um

planejamento estatístico para otimizar o produto de liberação lenta formado por alginato/capsul® e aplica-lo em microcosmo para biorremediação de óleo em ambiente marinho.

6.3 Terceira Etapa – Determinação da melhor relação N e P e aplicação do encapsulado de liberação lenta.

Nesta etapa, para se fazer uma avaliação mais completa do efeito de bioestímulo dos microrganismos degradadores pelo encapsulado de liberação lenta em ambiente marinho com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, foi realizado uma análise estatística a partir do Planejamento Experimental, utilizando o software comercial *Statística 7.0*, criado pela Statsoft, conforme descrito no item 5.3.1 do materiais e métodos.

Dentre os vários tipos de planejamento experimental, o fatorial é um dos mais eficientes, utilizados e aplicados em pesquisas básicas e tecnológicas e é classificado como um método do tipo simultâneo, onde as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

Vários estudos têm reportado a utilização desta ferramenta estatística para investigação da otimização da biorremediação entre eles a biodegradação de naftaleno por *Pseudomonas sp.* (PATHAK et al, 2009), a otimização de nutrientes e inóculos para biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (VIEIRA et al, 2009), e a otimização de componentes nutricionais para degradação de óleo diesel (HUANG et al, 2008).

Muitos pesquisadores tem analisado em seus estudos o impacto da suplementação de nitrogênio e fósforo na biorremediação de petróleo bruto em ambientes marinhos (KNEZEVICH et al., 2006; NIKOLOPOULOU & KALOGERAKIS, 2009; ZAHED et al, 2010). No entanto, a duração ideal do tratamento e concentração de nutrientes ainda não é conhecida para a biorremediação de petróleo bruto e óleos mistos na água do mar. Por isso, o planejamento fatorial realizado nesta etapa envolveu a avaliação de dois fatores: concentração de nitrogênio e a concentração de fósforo. Considerando esses fatores e seus níveis, foi possível gerar no software a matriz apresentada na tabela 8. A variável resposta foi a porcentagem de degradação de HTP (Hidrocarboneto Totais do Petróleo) ao final de 30 dias.

Tabela 8: Matriz do Planejamento Fatorial Completo (2^2) com réplica de ponto central dos testes de biodegradação em microcosmos, gerada pelo *software statística 7.0.*

Experimentos	Nitrogênio	Fósforo	Degradação (%)
1.0	10	1	47,46
2.0	15	1	8,56
3.0	10	10	55,39
4.0	15	10	61,84
5.0	12,5	5,5	46,7
Rep 1	10	1	44,24
Rep 2	15	1	7,8
Rep 3	10	10	50,72
Rep 4	15	10	62,21
Rep 5	12,5	5,5	55,91

*Rep, significa réplica de cada amostra correspondente.

*Concentração do nitrogênio: 10 (-1), 15 (+1) e 12,5 (0); Concentração de fósforo: 1 (-1), 10 (+1) e 5,5 (0) na forma decodificada.

Com o objetivo de obter o máximo de informação na realização do planejamento fatorial, este planejamento foi realizado com replicas de todos os ensaios inclusive do ponto central para que se possa estimar o erro experimental.

Na tabela 8, a matriz do planejamento fatorial apresenta os resultados de degradação de óleo para todas as condições e suas réplicas. Desta forma pode se observar que o experimento 4 representado pela relação 15:10/ N:P e sua réplica, foram os ensaios que apresentaram os maiores valores de degradação alcançando respectivamente 61,84% e 62,21% de óleo degradado. Já o experimento 2 representado pela relação 15:1/ N:P e sua replica, apresentaram as menores porcentagem de degradação, com 8,56% e 7,8% de óleo degradado.

O experimento 1 e sua réplica, representada pela relação 10:1/N:P apresentada na tabela 8, mostra respectivamente uma degradação de 47,46% e 44,24% de óleo no sistema estudado, enquanto que o experimento 3 e sua réplica representado pela relação 10:10/ N:P, apresentaram respectivamente 55,39 % e 50,72 % de degradação do óleo no sistema.

O experimento 5 e sua réplica, visualizado na tabela acima, representam a duplicata do ponto central, seus valores reais na relação entre a nitrogênio e fósforo são de 12,5:5,5; esta representação originou degradação respectivamente de 46,7% e 55,91% do óleo no sistema.

Com estes resultados é possível notar que as relações de N:P, tem um importante papel na bioestimulação dos microrganismo envolvidos. Analisando os valores médios da degradação de cada experimento, observa-se que o melhores resultados obtidos foram os experimentos com relações 15:10/ N:P; e 10:10/ N:P, mostrando que estes proporcionaram um bom balanço nutricional para o sistema estudado.

Muitos estudos têm demonstrado que a otimização na razão entre o abastecimento de nitrogênio e fósforo em processos de biorremediação implica não só em melhores taxas de biodegradação de petróleo, mas também alteração no perfil na composição da comunidade microbiana. (SMITH et al 1998;WOLICKA et al, 2009; MEGHARAJ et al 2011).

Para compreendermos melhor os resultados obtidos no planejamento experimental, os dados devem ser interpretados seguindo vários critérios estatísticos e de significância, dentre os quais destacam-se: o cálculo dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável dependente e as interações entre elas, o Teste p e a análise da variância, ao se trabalhar com modelo das variáveis escalonadas (nível superior representado por +1 e -1, descrito em materiais e método) segundo Trindade, 2002. Tais critérios estatísticos podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9: Análise de Variância (ANOVA) gerada pelo *Software Statística* 7.0

FACTOR	ANOVA; Var: Degradação (%); R-sqr=0,94672; Adj: 0, 92009				
	SS	dF	MS	F	**p**
(1) N	1863,551	1	1863,551	59,08184	**0,000254**
(2) P	411,845	1	411,845	13,05709	**0,011184**
1 by 2	1087,645	1	1087,645	34,48258	**0,001080**
Error	189,251	6	31,542		
Total SS	3552,292	9			

Na análise de variância pela ANOVA o parâmetro estatístico denominado p-level, permite avaliar quais fatores e suas interações são estatisticamente relevantes. Segundo Calado & Montgomery, 2003, os valores de p-level só apresentam significância ou relevância estatística quando cada um dos fatores e interações apresentarem valores menores ou iguais a 0,05.

Os fatores analisados no teste de biodegradação em microcosmos foram relação entre nitrogênio e fósforo. Como os valores de p-level observados para os fatores na tabela 9 são todos menores que 0,05, e por isso aparecem em negrito, significa que os efeitos de cada fator e a interação entre eles são relevantes. Mohajeri et al. (2010) também utilizou a ANOVA para avaliar a significância estatística das concentração inicial de óleo, biomassa e as concentrações de nitrogênio e fósforo na remoção de óleo em sedimento costeiro por 60 dias, isto proporcionou a otimização da biodegradação capaz de remover 83,13% do óleo presente no sedimento.

Segundo Aghamiri, et al (2011) em seu estudo sobre otimização das condições ideais para biorremediação de óleo em solo contaminado, a utilização do método Taguchi, ferramenta estatística que analisa o percentual de contribuição de cada variável através da determinação da analise de variância (ANOVA), mostrou uma remoção de 68% de óleo em 20 dias experimentais.

O diagrama de Pareto, figura 20, é uma outra forma de apresentar a relevância estatística, mostrando, de forma rápida e clara, os efeitos que são estatisticamente importantes.

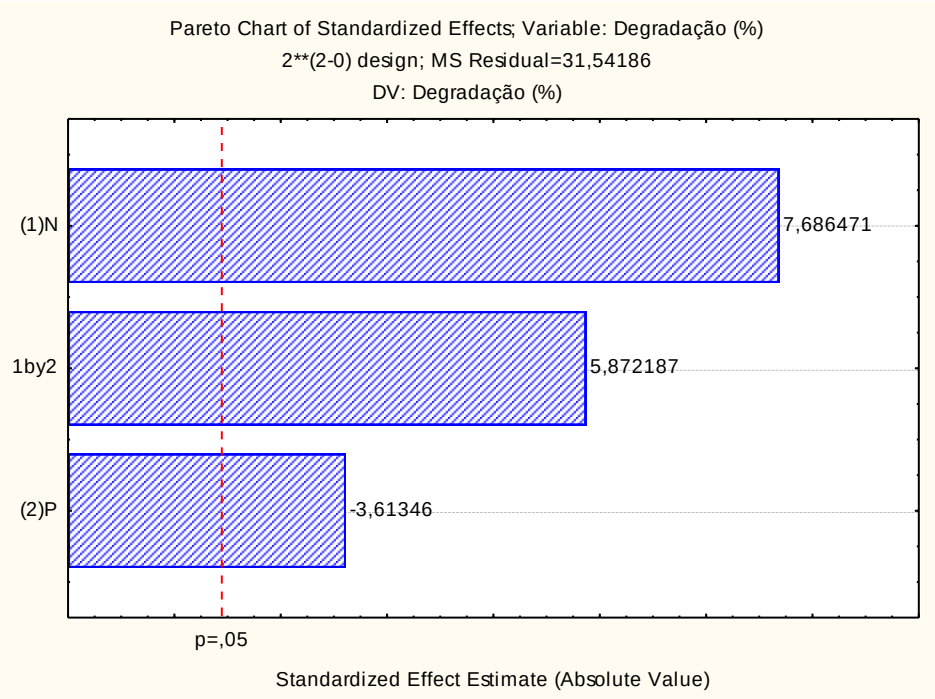


Figura 20: Gráfico de Pareto, gerado pelo *Software Statística 7.0.*

De acordo com Calado e Montgomery (2003), os efeitos cujos retângulos estiverem ultrapassando à direita da linha tracejada em vermelho (p=0,5) apresentam relevância estatística. Esta figura 20 reitera o que foi observado anteriormente pela ANOVA, que tanto os valores de N, quanto os valores de P e sua interação são significativos. Porém é observado que N e as interações de N e P possuem valores positivos, e que a variável N tem maior efeito

significativo estatísticamente para o sistema estudado. Já a variável P possui valor negativo, isto significa que ao analisar individualmente esta variável ela interfere negativamente no resultado de biodegradação do óleo, ou seja, neste sistema de biorremediação estudado, os melhores índices de degradação do óleo foram obtidos quando a relação dos nutrientes disponíveis no sistema apresentou uma quantidade de fósforo menor que a quantidade de nitrogênio.

Alguns estudos de investigação na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo tem demonstrado que o nitrogênio exerce um efeito mais forte do que o fósforo no processo de biodegradação (HUANG et al, 2008; VIEIRA et al, 2009).

Para melhorar a observação das tendências de como os fatores estudados influenciam na degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo, foi obtido o gráfico de superfície de resposta. (figura 21).

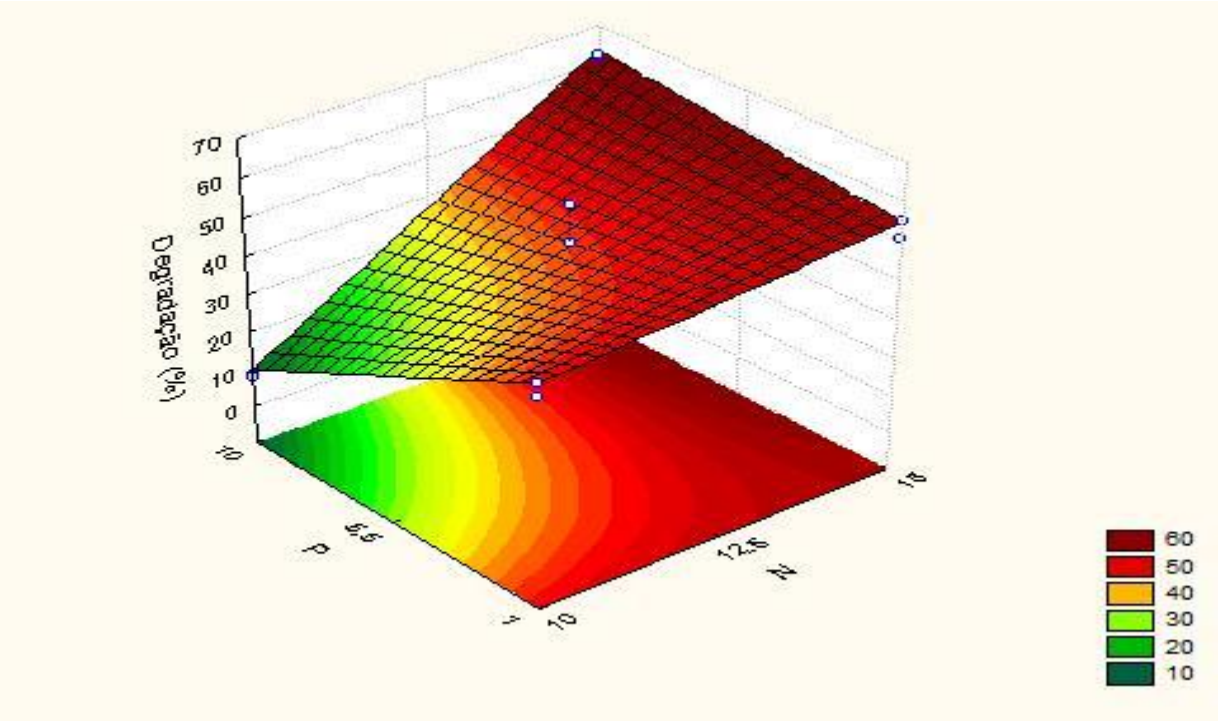


Figura 21: Gráfico de superfície de resposta.

A superfície de resposta apresentado na figura 21, confirma que os níveis superiores de nitrogênio e fósforo, juntos fornecem as maiores porcentagens de degradação de óleo. Isto é facilmente observado na legenda da figura 21, em que a cor vermelha escura indica a região de maior percentual de óleo degradado.

6.4 Análises completas da biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo nos sistemas estudados

Nesta etapa final foram analisados os comportamento de cada sistema de forma completa, quantificando-se os teores residuais de nitrogênio, fósforo, proteínas totais e o

impacto ambiental na ecologia dos microrganismos envolvidos na bioremediação do óleo ao longo de todo o experimento, cujo os resultados estão mostrados na tabela 10.

Tabela 10: Análise das concentrações de nitrogênios totais, fósforos totais e proteínas totais ao longo de 30 dias de experimento em microcosmo

Ensaios experimentais	Nitrogênios totais (mg/L)			Fósforos totais (mg/L)			Proteínas totais (mg/L)		
	Tempo (dias)								
	0	15	30	0	15	30	0	15	30
Atenuação Natural	8,32	4,03	2,67	1,3	0,57	0,32	21,01	51,13	77,28
Osmocote (10-10)	7,47	32,73	41,35	3,0	4,46	1,05	25,76	101,06	220,74
Experimento 1 (10-1)	10,9	25,55	43,73	3,24	6,89	1,78	24,18	83,23	193,40
Experimento 2 (15-1)	17,08	22,65	29,06	6,65	17,35	8,59	29,84	89,26	132,28
Experimento 3 (10-10)	15,3	26,56	19,3	3,24	4,71	2,27	27,35	64,20	217,03
Experimento 4 (15-10)	16,2	24,60	14,89	3,0	11,03	3,0	26,07	121,67	232,63
Experimento 5 (12,5-5,5)	14,19	25,16	19,19	3,24	12,48	3,49	29,375	69,75	197,06

No experimento de atenuação natural apresentado na tabela 10 é possível observar uma concentração inicial de nitrogênio total de 8,32mg/L, concentração de fósforo 1,3 mg/L e concentração proteica de 21,01mg/L. Decorridos 15 dias de experimento tanto a concentração nitrogênio, quanto a concentração de fósforo apresentaram redução, alcançando respectivamente os valores de 4,03mg/L e 0,57mg/L, a massa proteica aumentou para 51,13mg/L. Ao final de 30 dias as concentrações de nitrogênio e fósforo continuaram decrescendo os valores para 2,67mg/L e 0,32mg/L respectivamente e a massa proteica aumentou a concentração para 77,28mg/L.

Pode-se observar na tabela 10, que o experimento com Osmocote®, apresentou uma concentração inicial de nitrogênio de 7,47 mg/L, uma concentração de fósforo de 3,0 mg/L e uma concentração proteica de 25,76 mg/L. Após 15 dias de experimento a concentração de nitrogênio passou para 32,73 mg/L e a de fósforo para 4,46 mg/L, seguida do aumento da concentração de proteína para 101,06 mg/L. Com 30 dias a quantidade de nitrogênio passou para 41,35 mg/L e a de proteína para 220,74 mg/L, em contrapartida o valor da concentração de fósforo reduziu para 1,05 mg/L.

Ao visualizar o experimento 1 na tabela acima,observa-se que este iniciou com 10,9 mg/L de nitrogênio, 3,24 mg/L de fósforo e massa proteica de 24,18mg/L. Após 15 dias a

concentração de nitrogênio passou para 25,55 mg/L, seguida de um aumento das concentrações de fósforo e proteína, alcançando respectivamente 6,89 mg/L e 83,23 mg/L. Com 30 dias o experimento apresentou um novo aumento, atingindo o valor de 43,73 mg/L, com redução na concentração de fósforo para 1,78 mg/L e um aumento na concentração proteica para 193,40 mg/L.

No experimento 2, observa-se que as concentrações iniciais de nitrogênio, fósforo e proteínas iniciais foram respectivamente 17,08 mg/L; 6,65 mg/L e 29,84 mg/L. Após 15 dias de experimento as concentrações apresentaram um ligeiro aumento: nitrogênio passou para 22,65 mg/L, fósforo para 17,35 ,mg/L e proteínas 89,26 mg/L. Ao final de 30 dias a concentração de nitrogênio continuou aumentando apresentando um valor de 29,06 mg/L, já concentração de fósforo apresentou uma redução chegando ao valor de 8,59 e o valor de proteína apresentou um para 132,28 mg/L.

Na tabela 10, também é possível visualizar o comportamento do experimento 3, que iniciou com uma concentração de 15,3 mg/L de nitrogênio 3,24 mg/L de fósforo e 27,35 mg/L de proteína. Ao longo de 15 dias de experimento a concentração de nitrogênio passou para 26,56 mg/L, enquanto a concentração de fósforo passou para 4,71 mg/L, e a concentração de proteína aumentou para 64,20 mg/L. Com 30 dias a concentração de nitrogênio e fósforo apresentaram uma redução para 19,3 mg/L e 2,27 mg/L, no entanto a concentração de proteínas apresentou um aumento expressivo em sua concentração, chegando a 217,03 mg/ L.

Ao observar o experimento 4 na tabela 10 é possível notar que este experimento apresentou inicialmente uma concentração de nitrogênio total de 16,2 mg/ L, com 3,0 mg/ L de fósforo e 26,07 mg/ L de proteína. Com 15 dias a concentração de nitrogênio passou para 24,6 mg/ L, a de fósforo para 11,03 mg/L e a concentração de proteína para 121,67 mg/ L. Ao final de 30 dias de experimento a concentração de nitrogênio e fósforo apresentaram uma redução nos seus valores, respectivamente para 14,89 mg/L e 3,0 mg/ L, no entanto as concentrações de proteínas totais aumentaram, chegando a 232,63 mg/ L.

Os resultados do experimento 5, mostram concentração inicial de nitrogênio de 14,19 mg/ L, com 3,24 mg/ L de fósforo e 29,37 mg/ L de proteína. Após 15 dias a concentração de nitrogênio passou para 25,16 mg/ L a de fósforo para 12, 48 mg/ L e 69, 75 mg/ L de proteína. Ao término de 30 dias do experimento a concentração de nitrogênio apresentou uma redução na sua concentração para 19,19 mg/ L, a de fósforo passou para 3,49 mg/ L, já concentração proteica passou para 197,06 mg/ L.

A análise dos experimentos apresentados na tabela 10, nos mostra que todos os encapsulados compostos por alginato/ capsul® ao entrarem em contato com a água no instante zero, apresentaram uma pequena liberação de seus nutrientes, estes resultados podem

ser comparados com o experimento de atenuação natural no qual não foi introduzida nenhuma fonte nutricional apresentando os menores valores nutricionais no instante zero.

O experimento composto pelo produto de liberação lenta osmocote® apresentou valores residuais no sistema diferentes do experimento 3, composto pelas capsulas de alginato/capsul®, apesar de apresentarem a mesma relação inicial de N:P. Isso provavelmente ocorreu devido ao Osmocote® possuir uma matriz encapsulante diferente das capsulas produzidas neste trabalho. Segundo Mendonça et al (2008), o Osmocote® é um produto de liberação lenta a base de resina orgânica capaz de liberar nutrientes ao entrar em contato com altos teores umidades.

As análises dos experimentos formados por encapsulados de alginato/capsul®, e Osmocote®, em que as fontes nutricionais de nitrogênio e fósforo se encontram retidas nessas respectivas matrizes demonstraram serem eficientes nos abastecimentos nutricionais nos processos de biorremediação, pois observando a tabela 10, verifica-se bom aproveitamento por parte dos microrganismos já que esses ao longo do tempo obtiveram aumento contínuo em suas massas proteicas.

É importante chamar atenção para os resultados de quantificação de nitrogênio e fósforo apresentados na tabela 10, esses representam valores residuais no sistema estudado, ou seja, quantidade de nutrientes livres no sistema do qual os microrganismos não fizeram uso, de um total disponibilizado de maneira lenta pelas matrizes poliméricas. Por isso apesar da relação nutricional aprisionada na matriz proporcionar um bom estímulo microbiano, não conseguimos afirmar que esta relação de proporcionalidade se manteve por todo o período analisado. Porém é observado que essas quantidades residuais livres no meio apresentam valores baixos, reduzindo as chances de provocarem eutrofização por excesso de nutrientes. Segundo Das & Chandran (2011), o excesso de nutrientes livres podem inibir as atividades dos microrganismos degradadores de óleo e assim ao invés de remediar, acaba impactando negativamente o ambiente.

Na figura 22 abaixo, é possível analisar a percentagem de degradação de HTP (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo) em cada experimento ao final de 30 dias.

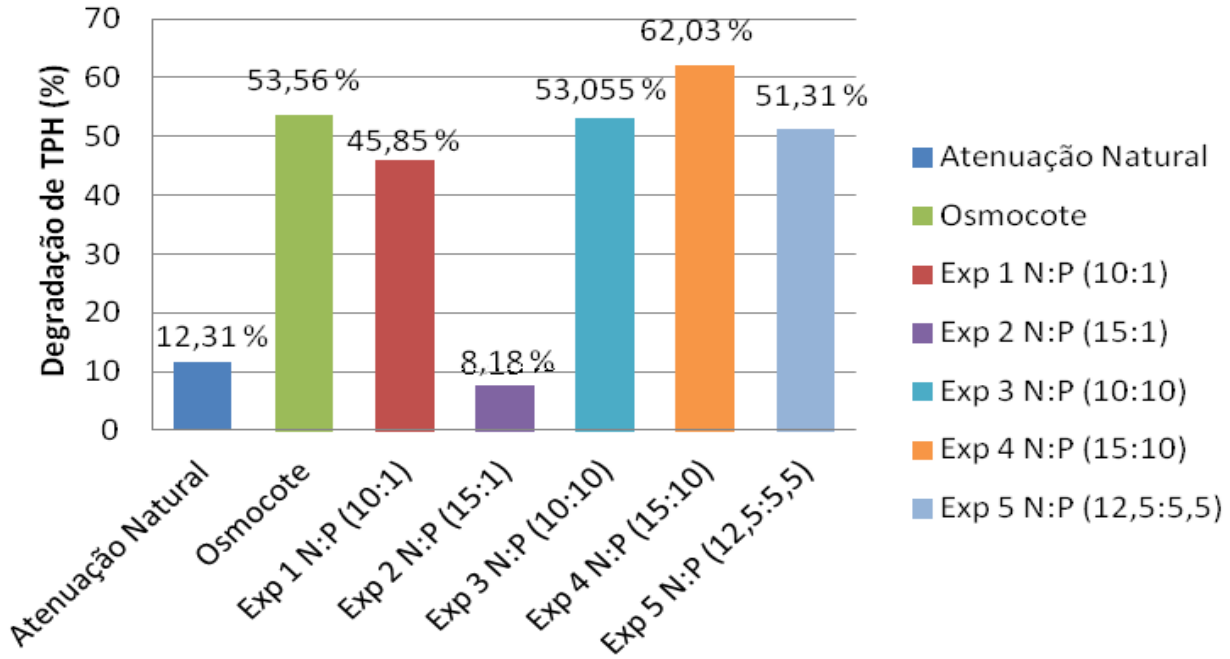


Figura 22: Porcentagem de remoção de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo.

Nesta figura é possível observar que a atenuação natural foi responsável pela degradação de 12,31% de HTP, já o experimento formado por Osmocote® apresentou uma degradação de 53,56%. Também é observado que o experimento 2 composto pela razão N:P (15:1) não proporcionou uma boa relação nutricional para o sistema estudado pois apresentou uma degradação de 8,18% ao longo de 30 dias, este resultado foi o que proporcionou a menor bioestimulação microbiana no sistema, inferior até mesmo ao experimento de atenuação natural.

Nos experimentos em que a relação de nitrogênio e fósforo imobilizado em matrizes de algianto de cálcio/ capsul®, apresentaram variação de 8, 18% a 62,03% de degradação de hidrocarboneto de petróleo. Quando a relação foi de 10:10 (N:P) o percentual de degradação foi de 53,08% de HTP, valor este bem próximo do experimento em que foi usado o Osmocote®. Apesar dos valores de massa proteicas serem diferentes ao longo do tempo, ao final de 30 dias seus ganhos proteicos foram muito próximos, o que refletiu em valores de degradações semelhantes.

Nesta mesma figura 22, observa-se que o experimento formado pela relação 15:10 (N:P) proporcionou não só os melhores ganhos proteicos (tabela 10) mas também a melhor degradação ao longo de 30 dias, apresentando um valor de degradação de 62,03% de HTP.

Reis et al (2009), em seu estudo de Produção de cápsulas de liberação controlada para fins de bioremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos do petróleo, utilizou os mesmos polímeros a base de alginato /capsul® para encapsular NPK líquido e aplicou em sistema líquido com óleo a partir de meio mineral, conseguiu degradar 43,6% de HTP

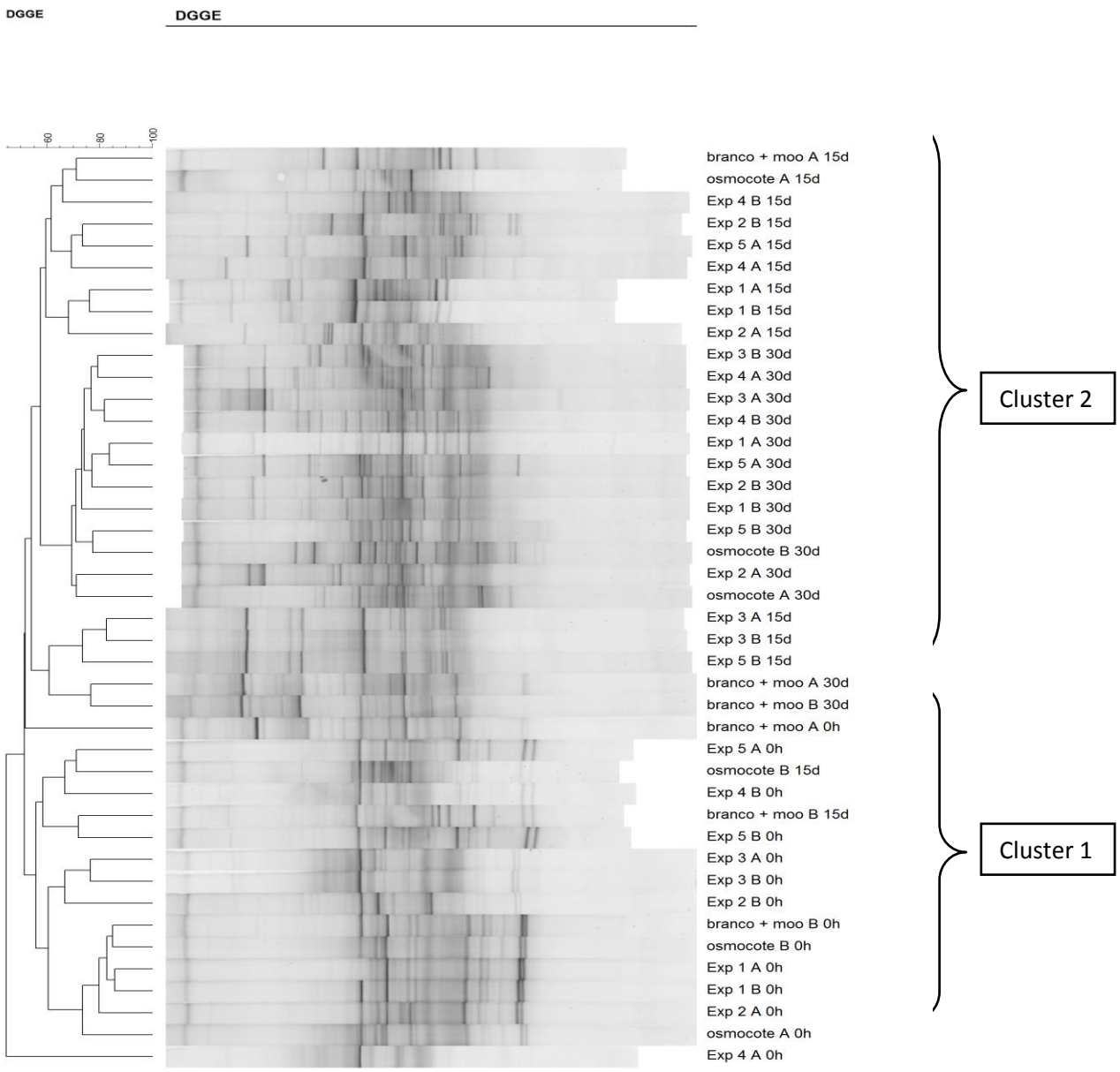
(Hidrocarboneto Total do Petróleo) em 30 dias de experimento. Em um outro trabalho de biorremediação de derramamento de óleo em águas oceânicas, Warr et al 2013, produziram um fertilizante a base de argila com grande quantidade nutrientes encapsulada por carboximetilcelulose e ao simular a aplicação deste conseguiu reduzir em 98% a concentração de alcanos totais presente no óleo em 1 mês.

6.5 PCR-DGGE

O conhecimento acerca da biodegradação de compostos poluentes no meio ambiente tem sido bastante estudado através de métodos convencionais de cultivo em laboratório, isolando microrganismos degradadores, com potencial para atuação nos processos de biorremediação. A aplicação recente das técnicas moleculares tem indicado uma maior diversidade de microrganismos presentes em áreas impactadas, muitos deles diferentes dos isolados em condições laboratoriais. Portanto, as técnicas de ecologia microbiana molecular servem para detectar espécies dominantes que os métodos convencionais não conseguiriam. A maior razão para a incapacidade de detecção pelos métodos de cultivo convencionais se deve a diferença nas condições fisiológicas impostas pelo ambiente natural e pelo cultivo em laboratório, onde o aporte de nutrientes é consideravelmente diferente (WATANABE et al, 2001).

É importante salientar que os resultados gerados por esta técnica devem ser analisados com cautela, pois a técnica está sujeita a vários erros nas diversas etapas moleculares (extração DNA, amplificação via PCR, DGGE).(SANTOS et al , 2012).

Os perfis de bandas apresentados na figuras 23 e 24, foram obtidos com os produtos de PCR, usando iniciadores para gene que codifica o rRNA 16S e separados por Electroforese em Gel Desnaturante (DGGE) e teve por objetivo identificar possíveis alterações no perfil da comunidade microbiana autóctone por ação da introdução dos produtos de liberação lenta.



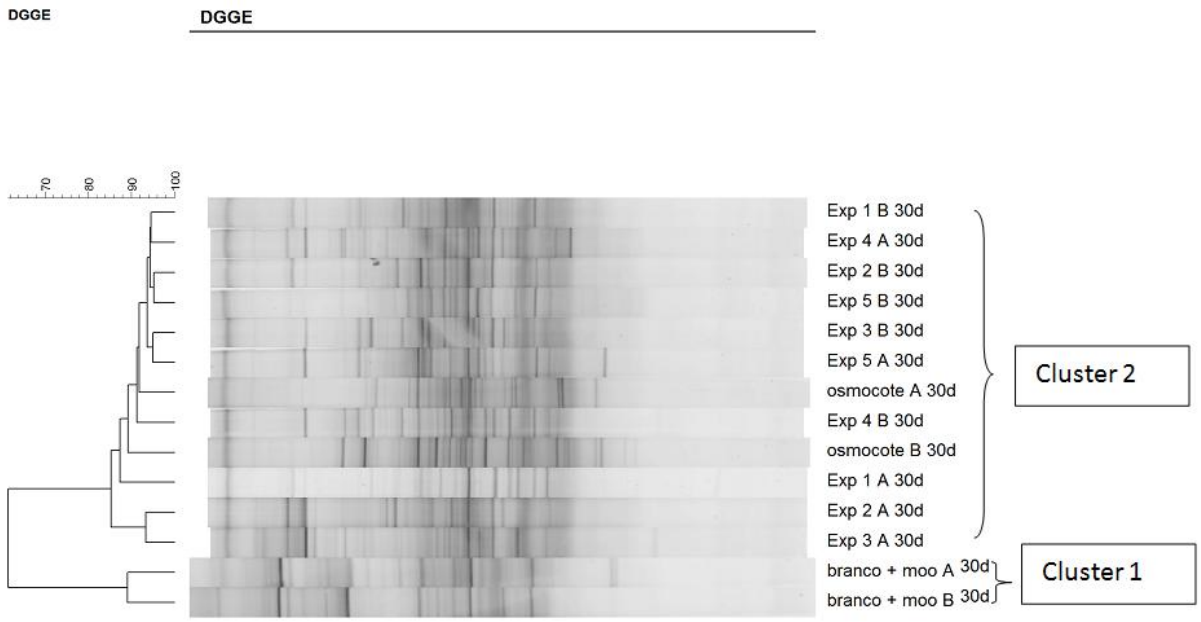
*As letras A e B, na figura acima, representam as réplicas de cada ensaio experimental.
*O experimento branco + moo, representa o ensaio da atenuação natural.

Figura 23: Dendograma do gel de DGGE para o gene que codifica o rRNA 16 S do domínio Bactéria, do experimento de microcosmo nos tempos 0, 15 e 30 dias.

O Perfil de bandas apresentado na figura 23, formado pelos géis nos tempos de 0,15 e 30 dias, mostram uma ampla variedades de bandas, com intensidades mais fortes e outras mais fracas, no entanto muito parecidas entre si. Na figura 23 é possível observar a formação de dois clusters distintos, o primeiro representado pelas amostras no tempo inicial de cada tratamento e o segundo cluster representado pelas mesmas amostras só que nos intervalos de 15 e 30dias. Estes resultados demostraram que em todos os tratamentos os impactos nas comunidades

microbianas foram parecidos e que não apresentaram diferenças significativas ao longo de 15 e 30 dias de experimento.

Como não foi observada uma distinção no perfil da comunidade nos intervalo de 15 e 30 dias, decidiu-se analisar somente o resultado final, conforme apresentado na figura 24.



*As letras A e B, na figura acima, representam as réplicas de cada ensaio experimental.
*O experimento (branco + moo), representam o ensaio da atenuação natural.

Figura 24: Dendograma do Gel de DGGE dos experimentos de microcosmo em 30 dias.

A figura 24 representa a análise separadamente do gel experimental no intervalo de 30 dias de experimento. Ao observamos este gel é possível verificar a presença de 2 clusters bem definidos, em que o primeiro localizado na parte inferior da figura é representado pelo experimento de atenuação natural e sua duplicata (branco + microrganismos) e o segundo cluster na parte superior da figura representado pelos experimentos onde foram usados diferentes razão de N:P do produtos de liberação lenta alginat/capsul® e Osmocote®.

Com esses resultados pode-se presumir que houve uma interferência no perfil da comunidade microbiana autóctone quando comparado com o experimento de atenuação natural, já que este formou um cluster distinto. Porém não foi notado na figura acima qualquer alteração significativa quanto ao perfil da comunidade microbiana entre os tratamento com diferentes relações de N:P, mostrando que tanto o produto de liberação lenta formado por alginato/capsul®, quanto o produto Osmocote® apresentaram o mesmo perfil de interferência na comunidade local, sendo comprovado pelo eixo de similaridade localizado na parte superior da figura 24 que apresentou um valor de 90%.

Capítulo 7

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se chegar as seguintes conclusões:

- Foi possível produzir 4 diferentes produtos de liberação lenta de nitrogênio e fósforo, a partir dos polímeros alginato/capsul®, pectina cítrica, carboximetilcelulose e alginato de cálcio, para servirem como fonte de bioestímulo de microrganismo hidrocarbonoclástico
- Os polímeros alginatos e capsul®, associados, apresentaram uma boa interação entre eles e proporcionaram a construção de um produto de liberação lenta como fonte de nitrogênio e fósforo, que apresentaram os melhores resultados de proteção e disponibilização dos nutrientes encapsulados em sistema líquido quando comparados a outros polímeros (carboximetilcelulose, pectina, alginato de cálcio) utilizados neste estudados.
- A utilização da ferramenta estatística através do planejamento experimental foi um bom instrumento para investigar o efeito da concentração de N, P e suas interações nos estudos de bioestímulos microbianos na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em ambientes marinhos.
- No estudo do planejamento experimental foi possível obter um produto de liberação lenta com nitrogênio e fósforo na correlação 15:10 / N:P aprisionados na matriz alginato/capsul®, capaz de degradar 62,03% de óleo em um sistema de microcosmo marinho contaminado com 0,2% (p/v) de Combustível marítimo MF-380 em 30 dias, proporcionando uma degradação melhor que o produto de liberação lenta comercial Osmocote® (10:10 N/P) analisado no mesmo sistema.
- A Atenuação Natural neste mesmo sistema com uma contaminação de 0,2% (p/v) de óleo, proporcionou uma degradação de 8,18% de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo nos 30 dias estudados.

- Os resultados obtidos pela técnica de DGGE para analisar os impactos dos produtos de liberação lenta a base de alginato/capsul® e o produto Osmocote®, mostraram que as variáveis correlacionadas de nitrogênio e fósforo, parecem não ter apresentado mudanças significativas no perfil da comunidade bacteriana, já que todos estes experimentos foram enquadrados num mesmo cluster com 90% de similaridade.

Capítulo 8

PERSPECTIVAS

A fim de dar continuidade à linha de pesquisa na qual se insere este estudo, são sugeridas algumas perspectivas para otimizar a utilização de produtos de liberação lenta como fonte de bioestimulo de microrganismo degradadores de hidrocarbonetos do petróleo.

- Otimizar a relação nutricional para liberação lenta das outras matrizes produzidas neste estudo (pectina, carboximetilcelulose, alginato de cálcio), afim de se obter um produto que proporcione boa proteção dos nutrientes encapsulados e uma disponibilização no sistema contaminado por hidrocarboneto de petróleo, permitindo uma baixa concentração residual para evitar a ocorrência de eutrofização.
- Avaliar o uso do produto de liberação lenta de alginato/capsul® em outros sistemas com contaminação por óleo, como: sedimentos, areia de praia e solos.
- Realizar estudos integrados dos produtos de liberação lenta de alginato/capsul® com plantas, avaliando a fitorremediação em sistemas como o de manguezal e a interação com biosufactantes.
- Avaliar por outras técnicas potenciais grupos microbianos envolvidos nos processos de biorremediação do ambiente tratado frente ao uso do sistema de liberação lenta produzido, verificando se esses grupos específicos se alteram.

Capítulo 9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A; VIÑAS, M; SABATE, J; MANRESA, M. A; SOLANAS, M. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhannolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Biodegradation 15: 249-260, 2004.

AGHAMIRI, S.F; KABIRI, K; EMTIAZI, G. A Novel Approach for Optimization of Crude Oil Bioremediation in Soil by the Taguchi Method. J. Pet Environ Biotechnol. 2, (2): 110-116, 2011.

ALEXANDER, M; LOEHR, R. C. Bioremediation Review. Science 258, (5084): 874, 1999.

ALHAMDAN, A & SASTRY, S. K. Natural convection heat transfer between non-Newtonian fluids and an irregular shaped particle. Journal of Food Process Engineering.13: 113–124, 1990.

ALVAREZ, V. M; SANTOS, S.C.C; CASELLA, R; Vital, R. L; SEBASTIAN, G. V; SELDIN, L. Bioremediation potential of a tropical soil contaminated with a mixture of crude oil and production water. Journal of Microbiology and Biotechnology. 18: 1966-1974, 2008.

AN, H. R; MAINELIS, G; WHITE, L. Development and calibration of real-time PCR for quantification of airborne microorganisms in air samples. Atmospheric Environment. 40: 7924-7939, 2006.

ARBURTO, L. C; TAVARES, D. Q; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos. 18,(1): 45-48, 1998.

ASCHERI, D. P. R; MARQUEZ, M. O. M; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos. 23, (Supl): 1-6, 2003.

AULENTA, F; BIANCHI, A; MAJONE, M; PAPINI, M.P; POTALIVO, M. Assessment of natural or enhanced in situ bioremediation at a chlorinated solvent-contaminated aquifer in Italy: a microcosm study. Environment International. 31: 185-190, 2005.

AYOTAMUNO, M.J; KOGBARA, R. B; OGAJI, S. O; PROBERT, S. D. Bioremediation of a crude-oil polluted agricultural-soil at Port Harcourt, Nigeria. Appli. Energ. 83:1249-1257, 2006.

BAJPAI, S.K; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: part-1. Reactive e functional polymer. 66, (6): 645-658, 2006.

BASTOS, D. S; GOMES, K; ROCHA-LEAO, M. H. M. Ascorbic acid retaining using a new calcium alginate-Capsul based edible film. J. Microencap. 26: 97-103, 2009.

BAYARDINO, R.A. Petrobras e o Desafio da Sustentabilidade Ambiental. Monografia de bacharelado apresentada ao Instituto de Economia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.2004 Disponível em <http://www.ie.ufrj.br/gema>. Acesso em: junho de 2010.

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

BIRD, R. B; STEWART, W. E; LIGHTFOOD, E. N. Fenômenos do Transporte, Universidade de Wisconsin, edição internacional Wiley, 2005.

BORMANN, D; LEITE, S. G. F; ROCHA-LEÃO, MARIA H. Microencapsulation of passion fruit (Pathflora) juice in Capsul®. International Journal of Fruit Science (Online). 11: 376-385, 2011.

BOSZCZYK-MALESZAK, H; ZABOST, A; WOLICK, D; KACIESZCZENKO, J. Effectiveness of biodegradation of petroleum products by mixed bacterial populations in liquid medium at different pH values. Pol. J. Microbiol. 55 (1): 69-73, 2006.

BRITO, N. N; ZAMORA, P. P; NETO, A. L. O; DE BATTISTI, A; PATERNIANI, J. E. S; PELEGRlNI, R. T. Biorremediação e Controle Ambiental. IV Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP.2004. Disponível em: <http://www.ceset.unicamp.br/Ite/artigos/4fec02_2004> Acesso em 18/08/ 2009.

CALADO, V; MONTGOMERY, D. Planejamento de experimentos usando o Statistica. Rio de Janeiro:E-Papers Serviços Editoriais, 2003.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Curso Derrames de óleo no mar e os ecossistemas costeiros. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/gerenciamento-de-riscos/vazamento-de-oleo/236-ecossistemas-costeiros---impactos> acesso: abril 2011.

CHAÎNEAU, C. H; MOREL, J; DUPONT, J; BURY, E; OUDOT, J. Comparison of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil associated microbial populations in the soil. Soil Biology & Biochemistry 37: 1490-1497, 2005.

CHAILLAN, F; CHAÎNEAU, C. H; POINT, V; SALIOT, A; OUDOT, J. Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. Environmental Pollution. 144, (1): 255–265, 2006.

CHAN, E.S & ZHANG, Z. Bioencapsulation by compression coating of probiotic bacteria for their protection in an acidic medium. Process Biochemistry. 10: 3346-3351, 2005.

CHAN, E.S; LEE, B.B; RAVINDRA, P; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of calcium-alginate macrobeads produced through extrusion technique. Journal of Colloid and Interface Science. 338: 63-72. 2009.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. RESOLUÇÃO Nº 8, DE 03 DE JUNHO DE 2009.

COULON, F; MCKEW, B. A.; OSBORN, A.M.; MCGENITY, T.J.; TIMMIS, K..N. Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. Environ Microbiol 9: 177-186, 2007.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação – Tratamento para derrame de Petróleo. Ciência Hoje 179 (30): 32-37, 2002.

CUNHA, C. D; ROSADO, A. S; SEBASTIAN, G. V; SELDIN, L; VON DER WEID, I. Oil biodegradation by Bacillus strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. Appl Microbiol biotechnol 73, (4): 949-959. 2006.

DALLA-VECCHIA, R; SABRÃO, D; NASCIMENTO, M. G; SOLDI, V. Carboxymethylcellulose and poly (vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. Process Biochemistry. 40: 2677-2682, 2005.

D'ANNIBALE, A; ROSETTO, F; LEONARDI, V; FEDERICI, F; PETRUCCIOLI, M. Role of Autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology. (72), 1: 28-36, 2006.

DAS, N; CHANDRA, N. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. Biotechnology Research International. 1-13, 2011.

DIBBLE, J. T & BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Applied and Enviromental microbiology. 37: 729-739, 1979.

FAVARO-TRINDADE, C. S; PINHO, S. C; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. Brazilian Journal of Food Technology. 11, (2): 103-112, 2008.

FEDDERSEN, R. L; THORP, S.N. Sodium Carboxymetilcellulose. In: Whistler, R.L. and BeMiller, J.N. (ed), Industrial Gums – Polysaccharides and their derivatives. Academic Press, London. 537-577, 2007.

FERNANDEZ, M; LIMAVERDE, A; TERRA, A. C; CASTRO, I. B; WAGENER, A. L. R. Occurence of Imposex in Thais haemastoma: evidences of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza. Cadernos de Saúde Pública da FIOCRUZ, Brasil. 18, (2): 436-476, 2002.

FINOTELLI, P.V. Microencapsulação de Vitamina Antioxidante. 2002. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2002.

FRANCO, I; CONTIN, M; BRAGATO, G; DE NOBILI, M. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. Geoderma. 121: 17-30, 2004.

FRANCO, N. O; TAKETANI, R. G; ROSADO, A. S. Métodos moleculares para analise de comunidades microbianas em ambientes aquáticos: II.PCR. Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia. 35, (2): 56 – 59, 2006.

FRANCHETTI, S. M. M; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. Quim. Nova. 29, (4): 811-816, 2006.

FRITZEN-FREIRE, C. B; PRUDÊNCIO, E. S; PINTO, S. S; MUÑOZ, I. B; AMBONI, D. M. C. Effect of microencapsulation on survival of Bifid bacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. LTW – Food science and Technology. 50, (1): 39-44, 2013.

GERTLER, C; NÄTHER, D. J; CAPPELLO, S; GERDTS, G; QUILLIAM, R. S; YAKIMOV, M. M; GOLYSHIN, P. N. Composition and dynamics of biostimulated indigenous oil-degrading microbial consortia from the Irish, North and Mediterranean seas: a mesocosm study. FEMS Microbiol. Ecol. 81, (3): 530-536, 2012.

HAMDIA, H; BENZARTIB, S; MANUSADZIANASC, L; AOYAMAA, I; JEDIDID, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. Soil Biology & Biochemistry. 39: 1926-1935, 2007.

HASANSHAHIAN, M, EMTIAZI G. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. International Biodeterioration & Biodegradation. 62: 170-178, 2008.

HASSANSHAHIAN, M; EMTIAZI, G; CARUSO, G; CAPPELLO, S. Bioremediation (bioaugmentation / biostimulation) trials of oil polluted seawater: A mesocosm simulation study. Marine Environmental Research. 95: 28-38, 2014.

HEAD, I. M; JONES, D. M; ROLING, W. F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. Nature Reviews Microbiology. 4: 173-182, 2006.

HU, Z. F; DOU, J. F; LIU, X; ZHENG, X. L; DENG, D. Anaerobic biodegradation of benzene series compounds by mixed cultures based on optional electronic acceptors. J Environ Sci (China). 19, (9): 1049-54. 2007.

HUANG, L; MA, T; DAN, L; LIANG, F; LIU, R; LI, G. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by Rhodococcus erythropolis. Marine Pollution Bulletin. 56: 1714-1718, 2008.

KÄISTNER, U; HOFFMANN, H; DÖNGES R; HILBIG, J. Structure and solution properties of sodium carboxymethyl cellulose, Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp 124: 307-328, 1997.

KASAI, Y; KODAMA, Y; TAKAHATA, Y; HOAKI, T; WATANABE, K. Degradative capacities and bioaugmentation potential of an anaerobic benzenedegrading bacterium strain DN11. Environ Sci Technol. 41, (17): 6222-7, 2007.

KHANNA, R. C; BARUA, T. K. Effects of Marine Oil Spills. In: 4th Indian Oil Corp. Ltd. Int Petrol. Conf. Petrotech, Nova Deli, Índia. 9-12 Janeiro, 2001.

KIM, S; CHOI, D; SIM, D; OH, Y. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. Chemosphere. 59: 845-852, 2005.

KINGSTON, P. F; RUNCIMAN, D; MCDOUGALL, J. Oil contamination of sedimentary shores of the Galápagos Island following the wreck of Jessica. Marine Pollution Bulletin. 47: 303-312, 2003.

KIRBY, M. F; LAW, R. J. Oil spill treatment products approval: the UK approach and potential application to the Gulf region. Marine Pollution Bulletin. 56: 1243-7, 2008.

KNEZEVICH, V; KOREN, O; RON, E. Z; ROSENBERG, E. Petroleum bioremediation in seawater using guano as the fertilizer. Biorem. J. 10: 83–91, 2006.

LEE, T. H; BYUN, I. G; KIM, Y.O; HWANG, I. S; PARK, T. J. Monitoring biodegradation of diesel fuel in bioventing processes using in situ respiration rate. Water Sci Technol. 53, (4-5): 263-72, 2006.

LIANG, R; LIU, M. Preparation and properties of a double-coated slow-release and water-retention urea fertilizer. J. Agric. Food. Chem. 54, (4): 1392-1398, 2006.

LIU, H; XU, X. M; GUO, S. D. Rheological , texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics. LWT food Science and Technology. 40: 946-954, 2007.

MADENE, A; JACQUOT, M; SCHER, J; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. Int. J. Food sci. Tech. 41, (1): 1-21, 2006.

MAKI, H; SASAKI, T; HARAMAYA, S. Photo oxidation of biodegradable crude oil and toxicity of the photo oxidized products. Chemosphere. 44: 1145–1151, 2005.

MARGOT, M; OLLIVIER, B; PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. Antonie Van Leeuwenhoek. 77: 103-116, 2000.

MARIANO, J. B. Impactos Ambientais do Refino de Petróleo. Rio de Janeiro: Interciência. 2005.

MATIOLI, G; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos. 23, (Supl): 102-105, 2003.

MARSHALL A. G; ROGERS R. P. Petroleomics: the next grand challenge for chemical analysis. Analytical Chemistry Research. 37: 53–59, 2003.

MARTINS, A; DINARDI, A. L; FORMAGI, V. M; LOPES, T. A; BARROS, R. M; CONEGLIAN, C. M. R; BRITO, N. N; SOBRINHO, O. D; TONSO, S; PELEORINI, R. Biorremediação. III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP.2003. Disponível em: <www.ceset.unícamp.br/lte/artigos/3fec2401> Pesquisado em 16/08/2009.

MATTÉ, M.G; ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. Rev. Iberoam. Polim. 14, (5): 206-218, 2013.

MEGHARAJ, M; RAMAKRISHNAN, B; VENKATESWARLU, K; SETHUNATHAN, N; NAIDU, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. Environment International. 37: 1362-1375, 2011.

MENDONÇA, V; ABREU, N. A. A; SOUZA, H. A; TEIXEIRA, G. A; HAFLE, O. M; RAMOS, J. Diferentes Ambientes e Osmocote® na produção de mudas de tamarindeiro (Tamarindus indica). Ciênc. Agrotec. 32, (2): Lavras Mar/Apr. 2008.

MENEGHETTI, L.R.R. Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel. M.Sc., dissertação, Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul.2007.

MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, E. F. S. L. S; CARVALHO, D. D. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: Avaliação da adição de ramnolipídio quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação. 4º Congresso Brasileiro de P&D em petróleo e gás. Campinas,SP. 2007.

MOHAJERI, L; AZIZ, H. A; ISA, M. H; ZAHED, M. A. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments, Bioresource Technol. 101: 893-900, 2010.

MOLINA-BARAHONA, L; VEJA-LOYO, L; GUERRERO, M; RAMIREZ, S: ROMERO, I; VEGA-JARQUIN, C; ALBORES, A. Ecotoxicological evaluation of diesel contaminated soil before and after a bioremediation process. Environ Toxicol 20, (1): 100-9, 2005.

MORAIS, E. B & TAUK-TORNISIELO, S. M. Biodegradation of oil refinery residues using mixed-culture of microorganisms isolated from a landfarming. Brazilian Archives of Biology and Technology. 52: 1571-1578, 2009.

MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora UFLA, 2002.

MURRAY, A. E; HOLLIBAUGH, J.T; ORREGO, C. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient electrophoresis of 16SrDNA fragments. Applied and Environmental Microbiology. 62: 2676 – 2680.1996.

MUYZER, G; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek. 73, (1): 127-41. 1998.

NASCIMENTO, A. R; ARARUNA, J; ZIOLLI, R. L. Otimização e avaliação do desempenho de um método de determinação de TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) em areia por detecção no infravermelho. In: METROLOGIA – 2003 - Metrologia para a Vida. Sociedade Brasileira de Metrologia (SBM). Recife. Pernambuco. 2003.

NAKAGAWA, A. R; ANDRÉA, M. M. Efeito de Alterações nas Características do solo sobre a Degradação de Hexaclorobenzeno. Revista Brasileira de Ciências do Solo. 30: 575-582, 2006.

NEFF, J. M; BENCE, A. E; PARKER, K. R; PAGE, D. S; BROWN, J. S; BOEHM, P. D. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from buried shoreline oil residues thirteen years after the Exxon Valdez oil spill: a multispecies assessment. Environ Toxicol Chem. 25, (4): 947-61, 2006.

NIKOLOPOULOU, M; KALOGERAKIS, N. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons J Chem Technol Biotechnol. 84: 802–807, 2009.

NIKOLOPOULOU, M; EICKENBUSCH, P; PASADAKIS, N; VENIERI, D; KALOGERAKIS, N. Microcosm evaluation of autochthonous bioaugmentation to combat marine oil spills. New Biotechnology. 30, (6): 734-742, 2013.

PAIVA, E. P; LIMA, M. S; PAIXÃO, J. A. Pectina: Propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. Revista Iberoamericana de polímero. 10, (4): 196-211, 2009.

PATHAK, H; KANTHARIA, D; MALPANI, A; MADAMWAR, D. Naphthalene degradation by Pseudomonas sp.HOB1: In vitro studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms. Journal of Hazardous Materials. 166, (2-3): 1466-1473, 2009.

PIERUCCI, A. P. T. R; CARVALHO, L. M. J; Rocha-Leão, M. H. M. Degradation kinetics of ascorbic acid in a high carbohydratesupplement for athletes. Alimentaria (Madrid), Espanha. 256: 21-26, 2004.

PILIZOTA, V; SUBARIC, D; LOVRIC, T. Rheological properties of CMC dispersions at low temperatures. Food Technology and Biotechnology, 34, (2–3): 87–90, 1996.

POWELL, S. M; FERGUSON, S. H; BOWMAN, J. P; SNAPE, I. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. Microbial Ecology. 52: 523-532, 2006.

REIS, E. A; ROCHA-LEÃO, M. H; LEITE, S. G. F. Produção de cápsulas de liberação lenta de nutrientes para utilização na biodegradação de óleos. Diálogos & Ciência (FTC Feira de Santana. Impresso). 23, (8): 166-178, 2010.

REIS, E. A. Produção de cápsulas de liberação controlada para fins de bioremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos do petróleo. Dissertação, 2009, 59 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

RHIM, J. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. Lebensm - Wiss u - Technol. 37: 323-330, 2004.

RIBEIRO, E. P; SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. 2ª edição. São Paulo:Edgard Blücher, 33 – 75, 2007

RINAUDO, M. Polyelectrolyte properties of a plant and animal polysaccharide. Structural Chemistry. 20, (2): 277-289, 2009.

RIZZO, A. C. L; CUNHA, C. D; SANTOS, R; SANTOS, R. M; MAGALHÃES, M; LEITE, S. G. F; SORIANO, A. U. Preliminary Identification of the Bioremediation Limiting Factors of a Clay Bearing Soil Contaminated with Crude Oil. Journal of the Brazilian Chemical Society. 19: 169-174, 2008.

RODRÍGUEZ-NÚÑES, J. R; LÓPEZ-CERVANTES, J; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I; WONG, B. R; CHAVEZ, P. T; ROCHA, M. O. C. Antimicrobial activity of chitosan-based films against Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus. Int. J. Food Sci. Tech. 47, (10): 2127-2133, 2012.

ROLIN, C. Commercial pectin preparations. In Pectins and their manipulation, Seymour, C; Knox, P; Eds. Blackwell: Boca Raton. 222-24, 2002.

ROMANTSCHUK, M; SARAND, I; PETÄNEN, T; PELTOLA, R; JONSSON-VIHANNE, M; KOIVULA, T; YRJÄLÄ, K; HAAHTELA, K. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. Environmental Pollution, 107: 179-185, 2000.

ROSADO, A. S; DUARTE, G. F; SELDIN, L; VAN ELSAS, J. D. Molecular microbial ecology: minireview. Brazilian Journal Microbiology 28: 135-147. 1997.

SANTOS, H. F; CARMO, F .L; LEITE, D. C. A; JESUS, H. E; ROSADO, A. S; PEIXOTO, R. S. Comparison of different protocols for the extraction of microbial DNA from reef corals. Brazilian Journal of Microbiology. 43, (2): 1-9, 2012.

SANTACRUZ, I; GUTIÉRREZ, C. A; NIETO, M. I; MORENO, R. Application of alginate gelation to aqueous tape casting technology. Materials Research Bulletin, 37: 671-682, 2002.

SANTI, L; BERGER, M; SILVA, W.O. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. Caderno pedagógico, Lajeado. 11, (1): 130-139, 2014.

SCHNEEGURT, M. A; DORE, S.Y; KULPA, C. F. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. Curr Issues Mol. Biol. 5, (1): 1-8.2003.

SHILPA, A; AGRAWAL, S. S; RAY, A. R. Controlled delivery fo drugs from alginate matrix. Journal of Macromolecar Science Part C: Polymer Reviews. 43: 187-221, 2003.

SHIN, K. H; KIM, K. W. A biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of phenanthrene and diesel in sand. Environ Geochem Health. 26 (1): 5-11, 2004.

SILVA, P.R. Transporte marítimo de petróleo e derivados na costa brasileira: estrutura e implicações ambientais. 2004. 148f. Dissertação (Mestrado em Engenharia – Ciências e Planejamento Energético). Universidade Federal do Rio de Janeiro, rio de Janeiro, 2004.

SILVA, G. O; TAKIZAWA, F. F; PEDROSO, R. A; FRANCO, C. M. L; LEONEL, M; SARMENTO, S. B. S; DEMIATE, I. M. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 26, (1): 188-197, 2006.

SILVA, R. F. Estratégias de Bioestímulo de Sedimento de Manguezal Contaminado com Hidrocarbonetos empregando Fertilizantes de Liberação Lenta. 2008,116p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.

SMITH, V.H; GRAHAM, D. W; CLELAND, D. D. Application of resource-ratio theory to hydrocarbon biodegradation. Environ Sci Technol. 32: 3386-3395, 1998.

SOUZA, D. B.; BRITO, G. C. B.; VANCONCELOS, F. C. W.; BRAGA, L. C. Estudo de microrganismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. Revista de estudos ambientais, Blumenau. 12, (2): 38-46, 2010.

SUAVE, J; DALL'AGNOL, E. C; PEZZIN, A. P. T; SILVA, D. A. K; MEIER, M. M; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. Health and Environment Journal. 7, (2): 2006.

SWANNELL, R. P. J; MITCHELL, D; LETHBRIDGE, G; JONES, D; HEATH, D; HAGLEY, M; JONES, M; PETCH, S; MILNE, R; CROXFORD, R; LEE, K. A field demonstration of the efficacy of bioremediation to treat oiled shorelines following the Sea Empress incident. Environmental Technology. 20: 863-873, 1999.

TAKETANI, N. F. Influência do níquel na biorremediação de solo tropical multicontaminado com hidrocarbonetos de petróleo e na estrutura da comunidade microbiana. 2010, 77p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

TAKETANI R.G; ARAUJO, F.V; WEERELT, M.D.M; SANCHES-NUNEZ, M.L, ANISZEWSKI, E; ROSADO, A.S. Use of molecular approach to verify the influence of a eutrophic lagoon in the nearby ocean's bacterioplankton communities. Brazilian Journal Microbiology. 34: 51-52. 2003.

TANAKA, D; TANAKA, S; YAMASHIRO, Y; NAKAMURA, S. Distribution of oil-degrading bactéria in coastal seawater, Toyama Bay, Japan. Environ Toxicol. 23: 563-569.2008

TELHADO, M. C. S. C. L. Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo. 2009, 124p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro,

THAKUR, B. R; SINGH, R. K; PANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin - a review. Food Science and Nutrition. 37, (1): 47-73, 1997.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. M. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of Bacillus megaterium, Corynebacterium kutscheri and Pseudomonas aeruginosa. Bioresource Technology. 102: 772-778, 2011.

TRANSPETRO - Petrobras Transporte S.A <http://www.transpetro.com.br/TranspetroSite> acesso: Janeiro 2012.

TRINDADE, P. V. O; SOBRAL, L. G; RIZZO, A. C. L; LEITE, S. G. F; LEMOS, J. L. S. Evaluation of biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil. In: 9th INTERNATIONAL PETROLEUM ENVIRONMENTAL CONFERENCE, New Mexico, USA, 2002.

UENO, A; ITO, Y; YUMOTO, I; OKUYAMA, H. Isolation and caracterization of bacteria from soil contaminated with diesel and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 1739 - 45, 2007.

ULUDAG, H; DE VOS, P; TRESCO, P. A. Technology of mammalian cell encapsulation. Advanced Drug Delivery Reviews. 42: 29-64, 2008.

VAN HAMME, J. D; SINGH, A; WARD, O. P. Recent advences in petroleum microbiology. Microbial. Mol.Biol. Rev. 67: 503-549, 2003.

VENOSA, A. D; ZHU, X. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. Spill Science and Technology Bulletin. 8, (2): 163–178, 2003.

VIEIRA, P. A; FARIA, S; VIEIRA, R. B; DE FRANÇA, F. P; CARDOSO, V. L. Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculums concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 427–438, 2009.

VIEIRA, R. P; CLEMENTINO, M. M; CARDOSO, M; OLIVEIRA, D. N; ALBANO, R. M; GONZALEZ, A. M; PARANHOS, R; MARTINS, O. B. Archaeal Communities in a Tropical Estuarine Ecosystem: Guanabara Bay, Brazil. Microbial Ecology. 54: 460–468. 2007.

VON DER WEID, I.; MARQUES, J.M; CUNHA, C.D; LIPPI, R.K; DOS SANTOS, S.C;ROSADO, A,S; LINS, U; SELDIN,L. Identification and biodegradation potential of a novel strain of Dietzia cinnamea isolated from a petrolleum-contaminated tropical soil. Syst Appl Microbiol. 30, (4): 331-339. 2007.

WANG, S. C; CHEN, B. H; WANG, L. F; CHEN, J. S. Characterization of chondroitin sulfate and its interpenetrating polymer network hydrogels for sustained-drug release. International Journal of Pharmaceutics 329, (1-2), 103-109.2007

WARR, L. N.; FRIESE, A.; SCHWARZ, F.; SCHAUER, F.; PORTIER, R. J.; BASIRICO, L. M.; OLSON, G. M. Bioremediating Oil Spills in Nutrient Poor Ocean Waters Using. Biotechnology research International. 2013: 1-9, 2013.

Fertilized Clay Mineral Flakes: Some Experimental Constraints

WATANABE, K; KODAMA, Y; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. J. Microbiol Methods 44 (3): 253-262. 2001.

WATANABE, K; HAMAMURA, N. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. Current Opinion in Biotechnology. 14: 289-295, 2003.

WETLER-TONINI, R. M. C; REZENDE, C. E; GRATIVOL, A. D. Biodegradação bacteriana de petróleo e seus derivados. Rev. Virtual Quim. 3, (2): 78-87, 2011.

WILLATSA, W. G. T; KNOXB, P. J; MIKKELSENC, J. D. Pectina: new insights into an old polymer are starting to gel. Trends in food scince & Technology. 17: 97-104, 2006.

WOLICKA, D; SUSZEK, A; BORKOWSKI, A; BIELECKA, A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. Bioresour Technol. 100: 3221-3227, 2009.

WU, L; LIU, M; RUI, L. Preparation and properties of a double-coated slow-release NPK compound fertilizer with superabsorbent and water-retention. Bioresour Technol. 99, (3): 547-54.2008.

XIA, W. X; LI, J. C; ZENG, X. L; BI, X. L; SHAO, J. L. Enhanced biodegradation of diesel oil in seawater supplemented with nutrients. Eng Life Sci. 6: 80-85, 2006.

XU, R; OBBARD, J. P; TAY, E. C. T. Optimization of a slow release fertilizer dosage for bioremediation of oil-contaminated beach sediment in a tropical environment. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19: 719-725, 2003.

XU, R; LAU, N. L; NG, K. L; OBBARD, J. P. Application of a slow-release fertilizer for oil bioremediation in beach sediment. J Environ Qual. 33, (4): 1210-6, 2004.

XU, R; LAU, A. N; LIM, Y. G; OBBARD, J. P. Bioremediation of oil-contaminated sediments on an inter-tidal shoreline using a slow-release fertilizer and chitosan. Mar. Pollut Bull. 51,(8-12): 1062-70, 2005.

YAKIMOV, M. M; TIMMIS, K. N; GOLYSHIN, P. N. Obligate oil-degrading marine bactéria. Curr.Opin. Biotechnol. 18: 257-266, 2007.

YU, K. S; WONG, A. H; YAU, K. W; WONG, Y. S; TAM, N. F. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. Mar Pollut Bull 51, (8-12): 1071-7, 2005.

ZAHED, A .M; AZIZ, H. A; ISA, M. H; MOHAJERI, L; MOHAJERI, S. Optimal conditions for bioremediation of oily seawater. Bioresource Technology. 101: 9455-9460, 2010.

ZHANG, T; FANG, H. H. P. Aplications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. Applied Microbiology and Biotechnology. 70, (3): 281-289, 2006.