

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
MESTRADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
MODALIDADE PROFISSIONAL

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE BIORREMEDIAÇÃO NA ATENUAÇÃO DE PETRÓLEO

ALEXSANDRO DA SILVA ALVES

MACAÉ-RJ

2021

ALEXSANDRO DA SILVA ALVES

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE BIORREMEDIAÇÃO NA ATENUAÇÃO DE PETRÓLEO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, área de concentração Sustentabilidade Regional, linha de pesquisa Desenvolvimento, Sustentabilidade e Inovação.

Orientador(a): Dra. Angélica da Cunha dos Santos

MACAÉ-RJ

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A474a Alves, Alexsandro da Silva, 1989-.
Aplicação da técnica de biorremediação na atenuação de petróleo. /
Alexsandro da Silva Alves. — Macaé, RJ, 2021.
68 f.: il. color.

Orientadora: Angélica Cunha dos Santos, 1979-.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) — Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, Programa de Pós-graduação em
Engenharia Ambiental, Macaé, RJ, 2021.
Inclui referências.
Área de concentração: Sustentabilidade Regional.
Linha de Pesquisa: Desenvolvimento, Sustentabilidade e Inovação.

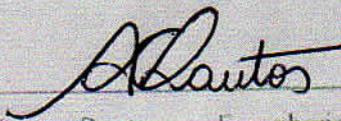
1. Biorremediação - Biotecnologia ambiental. 2. Água - Poluição por
petróleo. 3. Solos - Poluição por óleo. 4. Campos, Bacia de (RJ e ES). 5.
Fertilizantes químicos - NPK. 6. Petróleo - Legislação - Brasil. I. Santos,
Angélica Cunha dos, 1979-, orient. II. Título.

CDD 363.7 (23. ed.)

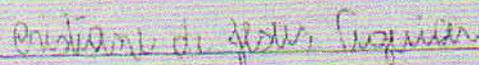
Dissertação intitulada **APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE BIORREMEDIAÇÃO NA ATENUAÇÃO DE PETRÓLEO**, elaborado por **Alexsandro da Silva Alves** e apresentado, publicamente perante a Banca Examinadora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental do Instituto Federal Fluminense - IFFluminense, na área concentração Sustentabilidade Regional, linha de pesquisa Desenvolvimento, Sustentabilidade e Inovação.

Aprovado em: 28/06/2021

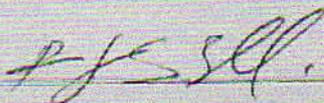
Banca Examinadora:



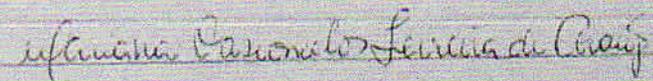
Angélica da Cunha dos Santos, Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais / Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Instituto Federal Fluminense (IFFluminense) – Orientadora



Cristiane de Jesus Aguiar, Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais / Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Universidade Estácio de Sá (UNESA)



Renato Gomes Sobral Barcellos, Doutor em Geociências / Universidade Federal Fluminense (UFF), Instituto Federal Fluminense (IFFluminense)



Mariana Vasconcelos Ferreira de Araújo, Mestre em Engenharia Ambiental / Instituto Federal Fluminense (IFFluminense), Instituto Federal Fluminense (IFFluminense)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por creditar em mim a capacidade para estar no processo de conclusão deste excelente curso. À minha família pelo apoio oferecido. À orientadora Angélica pela disposição e paciência para me orientar. Ao IFF e a todos os funcionários por me proporcionar sempre o melhor e ao corpo docente por ter agregado em mim conhecimentos importantes.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Número das ocorrências mundiais de derrames de petróleo levantadas em 2015... | 16 |
| Figura 2 – Número de derrames (> 7 toneladas) de 1970 a 2019..... | 17 |
| Figura 3 – Incidência dos derrames (> 700 toneladas) por operação no momento do incidente e a causa principal do derramamento, 1970-2019..... | 18 |
| Figura 4 – Bacia de Campos..... | 19 |
| Figura 5 – Vazamento acidental de petróleo do campo de Frade, na Bacia de Campos..... | 21 |
| Figura 6 – Estruturas químicas das classes de terpenóides..... | 42 |
| Figura 7 – Mecanismos de degradação aeróbica de n-alcenos..... | 45 |
| Figura 8 – Mecanismos de degradação aeróbica de isoalcenos..... | 46 |
| Figura 9 – Mecanismos de degradação aeróbica do ciclohexano..... | 47 |
| Figura 10 – Mecanismos de degradação aeróbica dos hidrocarbonetos aromáticos..... | 48 |
| Figura 11 – Fluxograma do experimento..... | 49 |
| Figura 12 – Unidades de simulação da Biorremediação da Fração de Saturados, Aromáticos e Saturados + Aromáticos, com a utilização do Fertilizante NPK, e as unidades de Controle, sem adição do fertilizante..... | 52 |
| Figura 13 – Cromatograma do óleo original proveniente da Bacia de Campos..... | 54 |
| Figura 14 – Resultado da análise do óleo da Bacia de Campos por cromatografia líquida..... | 55 |
| Figura 15 – Cromatograma mostrando a distribuição dos terpanos tricíclicos e pentacíclicos no óleo da Bacia de Campos usados para a obtenção das frações de compostos saturados e aromáticos..... | 55 |
| Figura 16 – Comparação entre os valores médios das razões de n-alceno/Hopano e de Fitano/Hopano das amostras de saturados coletadas das unidades de Biorremediação e Controle, contendo apenas a fração de hidrocarbonetos saturados, após 7 dias (A) e 21 dias (B) do início da simulação..... | 57 |
| Figura 17 – Comparação entre os valores médios das razões de n-alceno/Hopano e de Fitano/Hopano das amostras de saturados + Aromáticos coletadas das unidades de Biorremediação e Controle do experimento, após 7 dias (A) e 21 dias (B) do início da simulação..... | 58 |
| Figura 18 – Comparação entre os valores médios das razões de n-alcenos/Hopanos e Fitano/Hopano da análise das amostras das unidades de Biorremediação para as frações de saturado e saturado + aromático. Para 7 dias (A) e 21 dias (B) do início do | |

| | |
|------------------|----|
| experimento..... | 60 |
|------------------|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Vantagens e Desvantagens no emprego da biorremediação..... | 29 |
| Tabela 2 – Exemplos de gêneros de bactérias e fungos degradadores de petróleo..... | 43 |
| Tabela 3 – Compostos da família dos Terpanos correlacionando o número do pico, o nome do composto e sua fórmula molecular..... | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

API – American Petroleum Institute.

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas.

CG-DIC – Cromatografia Gasosa com Detector Ionizado por Chamas.

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE BIORREMEDIAÇÃO NA ATENUAÇÃO DE PETRÓLEO

RESUMO

Mesmo diante da aplicação de fontes alternativas de energias sustentáveis, o petróleo e seus derivados ainda representam a principal fonte energética do mundo e são largamente empregados como parte do desenvolvimento da sociedade moderna. Entretanto, o seu emprego, traz consigo consequências diretamente relacionadas à contaminação potencial do meio ambiente e um impacto significativo sobre a saúde dos seres vivos. A biorremediação é um processo intempérico de natureza biológica que se inicia nas estruturas menos às mais complexas e tem por finalidade a destruição completa dos contaminantes ou torná-los inofensivos, sendo, portanto, uma atividade natural e sustentável para o problema. Uma forma de avaliar o nível de degradação do petróleo se dá através da análise dos compostos biomarcadores, pois, estes são moléculas resistentes ao processo de biorremediação e, por isso, são usados em estudos de biodegradação em óleos severamente biodegradados. Impactos ambientais são processos iminentes levando-se em consideração o risco associado à manipulação do petróleo. A Lei nº 9.478, de 1997, conhecida como Lei do Petróleo, regulamenta a indústria petrolífera no Brasil e, conseqüentemente, suas atividades. No entanto, acidentes ambientais são intensificados em virtude da ausência de um órgão fiscalizador. Neste contexto, o instrumento jurídico de Estudo de Impacto Ambiental (EIA) ganha notoriedade no processo de licenciamento ambiental das atividades da indústria do petróleo impondo sanções penais, a pessoas físicas e/ou jurídicas, por atos que poluem, degradam ou colocam em risco o meio ambiente. A pesquisa foi desenvolvida em dois artigos, onde o primeiro teve como objetivo realizar uma revisão da literatura a fim de se obter conhecimento acerca da influência da biorremediação na sustentabilidade do meio ambiente e o segundo foi analisar o processo de biodegradação na atenuação dos derivados de um petróleo produzido na Bacia de Campos/RJ, por meio da bioestimulação. O ensaio se deu em unidades com e sem a presença do fertilizante com componentes das frações saturados e aromáticos do petróleo visando verificar a influência da presença dos componentes aromáticos sobre a biodegradação dos compostos saturados ao longo dos 21 dias de experimento. Foi possível constatar que o estimulante NPK agiu de forma positiva impulsionando a atividade microbiana a degradar uma maior fração dos componentes do petróleo e, também, atuou favoravelmente reduzindo a concentração de compostos biomarcadores, que são conhecidos por sua estabilidade atômica.

Palavras-chave: Biorremediação. Bioestimulação. Derrames de Petróleo. NPK.

APPLICATION OF THE BIOREMEDIATION TECHNIQUE IN OIL ATTENUATION

ABSTRACT

Despite the application of alternative and sustainable energy sources, oil and its derivatives still represent the main energy source in the world and are widely used as part of the development of modern society. However, its use brings consequences directly related to the potential contamination of the environment and a significant impact on the health of living beings. Bioremediation is a weathering process of a biological nature that starts from the least to the most complex structures and aims at the complete destruction of contaminants or rendering them harmless, being, therefore, a natural and sustainable activity for the problem. One way to evaluate the level of oil degradation is through the analysis of biomarker compounds, as these are resistant molecules to the bioremediation process and, therefore, are used in biodegradation studies in severely biodegraded oils. Environmental impacts are imminent processes considering the risk associated with handling oil. The Law nº 9,478 of 1997, known as the Petroleum Law, regulates the oil industry in Brazil and, consequently, its activities. However, environmental accidents are intensified due to the absence of an inspection agency. In this context, the legal instrument of Environmental Impact Study (EIA) gains notoriety in the process of environmental licensing of oil industry activities, imposing criminal sanctions on individuals and/or legal entities for acts that pollute, degrade or endanger the environment. The research was developed in two articles, where the first aimed to carry out a literature review in order to obtain knowledge about the influence of bioremediation on the sustainability of the environment and the second was to analyze the biodegradation process in the attenuation of derivatives of an oil produced in the Campos/RJ Basin, through biostimulation. For this, the test was carried out in units with and without the presence of NPK fertilizer with components of the saturated and aromatic fractions of petroleum in order to verify the influence of the presence of aromatic components on the biodegradation of saturated compounds over the 21 days of the experiment. At the end of the experiment, it was possible to verify that the NPK stimulant acted in a positive way, boosting the microbial activity to degrade a greater fraction of petroleum components, and also acted favorably by reducing the concentration of biomarker compounds, which are known for their atomic stability.

Keywords: *Bioremediation. Biostimulation. Oil Spills. NPK.*

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | 4 |
| LISTA DE TABELAS..... | 5 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | 5 |
| RESUMO..... | 6 |
| <i>ABSTRACT</i> | 7 |
| APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO..... | 9 |
| ARTIGO CIENTÍFICO 1: BIORREMEDIAÇÃO: UMA TÉCNICA SUSTENTÁVEL..... | 11 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 15 |
| 3. METODOLOGIA..... | 30 |
| 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 30 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 32 |
| ARTIGO CIENTÍFICO 2: AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE BIORREMEDIAÇÃO NA ATENUAÇÃO DE UM ÓLEO PROVENIENTE DA BACIA DE CAMPOS/RJ..... | 37 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 40 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 41 |
| 3. MATERIAL E MÉTODO..... | 48 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 54 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 61 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 63 |

APRESENTAÇÃO

Mesmo com o uso de novos métodos sustentáveis de geração de energia, os derivados do petróleo ainda são largamente empregados em diversos setores da economia mundial, por isso, inúmeros avanços científicos e tecnológicos são fornecidos à fim do melhor aproveitamento do petróleo. Por outro lado, faz-se necessário destacar que as atividades envolvendo o petróleo são os principais protagonistas em assuntos relacionados aos acidentes ambientais.

A alta demanda por derivados do petróleo, atrelada ao desenvolvimento tecnoindustrial, contribui para a ocorrência de derrames de petróleo, seja em meio oceânico e/ou continental, normalmente durante as atividades envolvendo a perfuração, produção, refino ou a distribuição do hidrocarboneto. Um óleo derramado está sujeito aos processos naturais de atenuação, ou seja, podem sofrer diluição, evaporação das frações leves do óleo, adsorção, dispersão, lixiviação e biodegradação. A biorremediação vem sendo amplamente empregada por se tratar de uma técnica de baixo custo efetivo, não intrusiva, ambientalmente amigável e por ser, comprovadamente, eficiente na recuperação de áreas contaminadas.

Um dos acidentes ambientais mais graves envolvendo derrames de óleo na história, ocorreu em 1989, quando o petroleiro norte-americano da Exxon Valdez colidiu contra um recife de corais no Alasca acarretando o derramamento de 42 mil toneladas de petróleo no oceano, causando severo impacto na fauna e flora local (HOSTETTLER; KVENVOLDEN, 1994). Com a dificuldade de remoção física do poluente, a petrolífera adotou a técnica de biorremediação e utilizou cerca de 48 toneladas de fertilizantes, distribuídos em diferentes pontos da costa, para aumentar a população natural de bactérias capazes de degradar o petróleo. Em três anos, a área contaminada foi reduzida para quase 1% da extensão original e a população bacteriana retornou aos níveis considerados normais antes do acidente. Outro exemplo, segundo a Scientific American (2010), onde as bactérias foram responsáveis por grande parte da degradação de óleo no Golfo do México, ocorreu após a explosão da plataforma de perfuração Deepwater Horizon, que operava para a petrolífera British Petroleum (BP), em 2010. O acidente derramou milhões de litros de petróleo no mar e atingiu mais de dois mil quilômetros de costa.

O princípio da técnica da biorremediação está baseado no uso da população microbiana que possui habilidade para modificar ou degradar certos poluentes, por exemplo as do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter* e *Achromobacter*, e pode ser estimulada pela adição de compostos nitrogenados e fosfatados, fornecido pelo fertilizante químico NPK, fundamentais para a bioaugmentação e a bioestimulação das reações bioquímicas (FLOODGATE, 1984; WHITESIDE,

1993). Mas essa técnica, assim como qualquer outra, tem limitações que podem estar associadas às quantidades de microrganismos no mar ou no solo e sua capacidade de degradar o contaminante, a biodisponibilidade dos contaminantes e as condições do ambiente como teor de oxigênio, nutrientes, pH, temperatura (MORGAN; WATKINSON, 1994).

Logo, é possível perceber que os impactos ambientais são riscos iminentes que estão atrelados às atividades do setor petrolífero, pois, os incidentes podem ser originados desde falhas em tubulações, máquinas à erros humanos. Por este motivo, é necessário que haja um equilíbrio entre o desenvolvimento econômico, gerado através da utilização do petróleo, e o meio ambiente em sua totalidade. Para isso, faz-se necessária a presença da legislação ambiental, criada com o intuito de preservar e proteger o meio, que tem por finalidade controlar e reduzir as ações devastadoras provocadas pelo homem. A legislação tem um papel primordial no desenvolvimento sustentável, pois, demanda uma postura que visa à preservação dos recursos naturais, a atenuação dos impactos ambientais e o desenvolvimento social definindo atos de infração e punições, à pessoa física e/ou jurídica, no descumprimento da mesma.

A dissertação é composta por três artigos de comunicação científica, onde um, intitulado AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE BIORREMEDIAÇÃO NA ATENUAÇÃO DE UM ÓLEO PROVENIENTE DA BACIA DE CAMPOS/RJ, teve sua publicação aceita pelo periódico Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego, em 06-05-2021. Entretanto, conforme normatização do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do IFFluminense, para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Ambiental, esta dissertação é composta por 2 artigos. O primeiro artigo, apresentado nesta dissertação trata-se de um artigo de revisão bibliográfica cujo objetivo foi elucidar a influência da biorremediação na sustentabilidade do meio ambiente e, por sua vez, fornecer consideráveis informações científicas para o desenvolvimento do segundo artigo. A segunda fase do trabalho, onde foi tratado o segundo artigo, foi proposto uma metodologia aplicada com o objetivo de verificar a influência do fertilizante NPK na biodegradação dos compostos saturados e aromáticos do petróleo. O Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo, LENEP/UENF, forneceu a amostra de óleo da Bacia de Campos/ RJ utilizada e o suporte laboratorial para as simulações da pesquisa.

Ao longo dos resultados, foi possível constatar que os compostos aromáticos dificultam a biodegradação dos compostos saturados por sua toxicidade, estabilidade, complexidade estrutural, dentre outros. Porém, também ficou evidenciado que os microrganismos, na escassez de estruturas menos complexas, ou seja, compostos saturados lineares, começam a degradar estruturas mais complexas, compostos aromáticos, saturados cíclicos e biomarcadores, como forma de obtenção de átomos de carbono (C) para a suas atividades metabólicas principais.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

BIORREMEDIAÇÃO: UMA TÉCNICA SUSTENTÁVEL

BIOREMEDIATION: A SUSTAINABLE TECHNIQUE

Alexsandro da Silva Alves - IFFluminense/PPEA

Angélica da Cunha dos Santos - IFFluminense/PPEA

RESUMO

A exploração por derivados de petróleo traz como consequência riscos de acidentes ambientais que impactam tanto em aspectos naturais quanto em socioeconômicos por falta de uma orientação específica acerca dos riscos ambientais atrelados aos riscos tecnológicos dessas atividades. O objetivo deste trabalho consistiu em fornecer informações acerca da importância da biorremediação, uma técnica ambientalmente segura e, economicamente, viável, na sustentabilidade do meio e esclarecer pontos sobre as disposições legais acerca da realidade das práticas governamentais em relação à manutenção da qualidade do meio ambiente no Brasil. Para o desenvolvimento do artigo foi proposta uma metodologia exploratória descritiva por meio da análise de materiais acadêmicos publicados nos indexadores Periódico CAPES, Google Acadêmico e os artigos foram obtidos a partir de combinações por meio de operadores booleanos. A análise dos artigos nos mostra que o volume de petróleo derramado em operações vem reduzindo com o passar dos anos, porém os vazamentos estão diretamente relacionados a falhas humanas na gestão do processo operacional e nos equipamentos. Neste sentido, a biorremediação pode ser empregada, diretamente, para minimizar os efeitos adversos causados por derrames desse petróleo sobre o meio ambiente e por ser uma técnica sustentável. Logo, conclui-se que a biorremediação pode ser melhorada através da bioestimulação que consiste na utilização de nutrientes, como o fertilizante químico NPK (10:10:10), e há escassez de uma regulamentação preventiva sobre a poluição causada por atividades do setor petrolífero, o que dificulta uma aproximação entre o desenvolvimento dessa atividade no país e a conservação do meio.

Palavras chave: Bioestimulação. Biorremediação. Derrames de óleo. NPK.

ABSTRACT

Exploration for petroleum derivatives brings as a consequence risks of environmental accidents that impact both natural and socioeconomic aspects due to the lack of specific guidance on the environmental risks linked to the technological risks of these activities. The objective of this work was to provide information about the importance of bioremediation, an environmentally safe and economically viable technique, in the sustainability of the environment and to clarify points about the legal provisions about the reality of government practices in relation to maintaining the quality of the environment in Brazil. For the development of the article, an exploratory descriptive methodology was proposed through the analysis of academic materials published in the indexes Periodical CAPES, Google Academic and the articles were obtained from combinations using Boolean operators. The analysis of the articles shows us that the volume of oil spilled in operations has been decreasing over the years, but the leaks are directly related to human failures in the management of the operational process and equipment. In this sense, bioremediation can be used directly to minimize the adverse effects caused by spills of this oil on the environment and because it is a sustainable technique. Therefore, it is concluded that bioremediation can be improved through biostimulation, which consists in the use of nutrients, such as the chemical fertilizer NPK (10:10:10), and there is a lack of preventive regulation on pollution caused by activities in the oil sector, which hinders an approximation between the development of this activity in the country and the conservation of the environment.

Keywords: *Biostimulation. Bioremediation. Oil spills. NPK.*

1. INTRODUÇÃO

Petróleo e seus derivados ainda representam a principal fonte energética do mundo e fazem parte do desenvolvimento da sociedade moderna como evidenciado por seu emprego nas indústrias petroquímicas e automobilísticas. As várias frações do petróleo fornecem insumos importantes para energia, transporte, insumo agrícola e síntese de polímeros. Porém, o crescimento da indústria petrolífera, quer seja pela exploração e/ou produção, transporte e derivados do óleo, pode acarretar derrames acidentais no ambiente marinho e/ou terrestre. Os acidentes químicos envolvendo hidrocarbonetos totais de petróleo são relativamente comuns, principalmente, durante a distribuição e transporte do óleo. Com isso a contaminação potencial do ar, água e solos juntamente com a toxicidade dos hidrocarbonetos do petróleo podem ter um impacto significativo sobre a saúde da sociedade (RUSSELL et al., 2009).

Pesquisas vem sendo realizadas, nos últimos anos, buscando estudar metodologias alternativas para a recuperação de locais poluídos, levando-se em consideração a natureza e a extensão da contaminação de solos e águas em todo o mundo e os custos envolvidos na remediação (ALENCAR et al., 2016; ANDRADE et al., 2015; WEBER; SANTOS, 2013). O comportamento de óleos derramados no mar e/ou em terra, depende da composição química do petróleo e, também, da atuação de processos como evaporação, emulsificação, dissolução, biodegradação, foto-oxidação e das interações entre óleo, sedimentos e correntes marinhas. A combinação destes processos é conhecida como intemperismo, o qual reduz a concentração de diferentes grupos de compostos, modificando as características químicas e físicas do petróleo derramado (ATLAS; HAZEN, 2011).

A velocidade e a extensão desses processos dependem das propriedades físicas e químicas do óleo original e de condições ambientais, como: temperatura, velocidade e direção dos ventos e das correntes marinhas. Como a presença de hidrocarbonetos de petróleo se dá naturalmente em ambientes marinhos e terrestres, em função das exsudações naturais de reservatório localizados em meio subterrâneo, houve tempo necessário para diferentes microrganismos evoluírem a capacidade de utilizarem os hidrocarbonetos, extravasados e/ou derramados, como fonte de carbono e energia para o seu crescimento, desenvolvimento e multiplicação (FIGUEIREDO, 1999). Essa adaptação dos microrganismos ao meio contaminado favoreceu a atenuação natural que inclui uma variedade de processos físicos, químicos e biológicos, que em condições favoráveis, agem sem intervenção humana para reduzir a massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentração de contaminantes no solo e lençóis freáticos, processo conhecido como biorremediação. Neste processo ocorrem

transformações físicas, químicas ou biológicas ou a completa destruição do contaminante, uma solução sustentável para o problema, que gera ou não efeitos ecológicos reduzidos (EPA, 1999).

A biorremediação, remediação com a utilização de microorganismos e nutrientes como fertilizante agrícola (NPK), tem gerado muito interesse como tecnologias eficazes de baixo custo e ambientalmente interessantes para a limpeza de poluentes orgânicos e inorgânicos (RAJAKARUNA, 2006). Existem centenas de espécies de bactérias, *archaea* e fungos que podem degradar o petróleo, porém a ação destes microorganismos não se dá de forma uniforme sobre todas as frações do petróleo, ou seja, a remediação dar-se-á seguindo a ordem de complexidade e toxicidade.

Os microorganismos necessitam de carbono e outros nutrientes como Nitratos (NO_3^-) e Fosfatos ($(\text{PO}_4)^{3-}$) presentes no fertilizante NPK para iniciar o processo de degradação dos componentes do petróleo. Quando grandes quantidades de hidrocarbonetos são liberadas no meio ambiente, como resultado de acidentes envolvendo as atividades de exploração, produção e distribuição de petróleo, é fundamental ter um fornecimento adequado desses nutrientes para acelerar as taxas de biodegradação e melhorar a eficiência das atividades microbianas sobre o petróleo derramado, processo conhecido como bioestimulação (ATLAS; HAZEN, 2011).

A biodegradação é um processo quase gradual em que os hidrocarbonetos se diferem na susceptibilidade ao ataque dos microorganismos sendo alguns compostos mais facilmente biodegradados que outros (PETERS et al., 2007). A progressiva degradação de óleo cru tende a remover primeiramente hidrocarbonetos saturados, concentrando componentes pesados polares e asfaltenos no óleo residual, o que gera uma perda da qualidade do óleo pela redução do grau API ($^\circ\text{API}$), aumento da viscosidade e aumento do teor de enxofre e metais (WENGER et al., 2002). O primeiro indicativo da biodegradação ocorre com a remoção seletiva de n-alcenos, seguidos por alcenos ramificados, aromáticos mais leves (benzeno, tolueno e xileno) e alcenos cíclicos, seguido pelas resinas e asfaltenos (PETERS et al., 2007). Os biomarcadores do petróleo são moléculas no qual sua estrutura ou cadeia carbônica podem ser relacionadas com moléculas encontradas em organismos vivos e resistentes ao processo de biodegradação, sendo por isso usadas em estudos de biodegradação em óleos severamente biodegradados (HUNT, 1979).

Este trabalho de pesquisa tem como objetivo analisar a degradação dos componentes das frações de compostos saturados e aromáticos, de forma individualizada e combinada, de um petróleo produzido na Bacia de Campos/RJ, por meio da bioestimulação. Com esta pesquisa foi possível realizar uma avaliação da técnica de biorremediação na atenuação de um óleo desta região. O estudo possibilita obter mais informações a respeito da contribuição do uso da técnica da biorremediação

assistida para a atenuação de um determinado derrame de óleo, fornecendo uma alternativa de solução para remediação de áreas contaminadas por petróleo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Derrames acidentais de petróleo

O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos com abundâncias diferenciadas dependendo da sua origem e transformações na composição do óleo durante o processo de migração, biodegradação e *water washing*, sendo os hidrocarbonetos os componentes majoritários. Os principais grupos de componentes dos óleos são os hidrocarbonetos saturados, os hidrocarbonetos aromáticos, as resinas e os asfaltenos. Porém, também elementos como enxofre, nitrogênio, oxigênio e metais podem ser encontrados no petróleo. (ROCHA, 2005; THOMAS, 2001).

O petróleo pode ser derramado durante as atividades de exploração, produção, refino, transporte ou estocagem. Durante a exploração e produção, o óleo é ocasionalmente lançado no solo como resultado de falhas em linhas, como produto da perfuração misturado a fluidos de perfuração ou através de vazamentos em tanques de armazenamento subterrâneo. E muitos combustíveis refinados como gasolina e diesel são frequentemente derramados acidentalmente durante o transporte e vazamento em tanques de armazenamento subterrâneo (SINGH; WARD, 2004; CLAUDE-HENRI, 2003).

A International Tanker Owners Pollution Federation - ITOPF, em 2015, realizou um levantamento que relaciona as principais causas dos vazamentos que levaram à contaminação do meio ambiente por hidrocarbonetos no mundo. Os resultados foram divididos em “operações” e “acidentes”, de acordo com a Figura 1, onde mostra que o maior número de ocorrências é representado pelas operações de carga e descarga. Destacam-se também o número de acidentes de colisão, encalhe e falha estrutural. O termo “outros/desconhecido” faz referência a vazamentos cujas informações não foram relevantes ou disponibilizadas. Estes resultados mostram que a introdução do petróleo no mar, na maioria das vezes, é proveniente de atividades rotineiras como carga, descarga e abastecimento (ITOPF, 2015).

Figura 1: Número das ocorrências mundiais de derrames de petróleo levantadas em 2015

| MASSA DE PETRÓLEO (t) | < 7 t | 7 - 700 t | > 700 t | Nº DE OCORRÊNCIAS |
|------------------------|-------|-----------|---------|-------------------|
| OPERAÇÕES | | | | |
| Carga/Descarga | 2817 | 327 | 30 | 3174 |
| Abastecimento | 548 | 26 | 0 | 574 |
| Outros operações | 1177 | 55 | 1 | 1233 |
| ACIDENTES | | | | |
| Colisão | 167 | 283 | 95 | 545 |
| Encalhe | 232 | 214 | 117 | 563 |
| Falha estrutural | 573 | 68 | 43 | 704 |
| Fogo/Explosão | 85 | 14 | 30 | 129 |
| Outros / Desconhecidos | 2176 | 144 | 24 | 2344 |
| <i>Total</i> | 7775 | 1151 | 340 | 9266 |

Fonte: Oil Tanker Spill Statistics - www.itopf.com (2015)

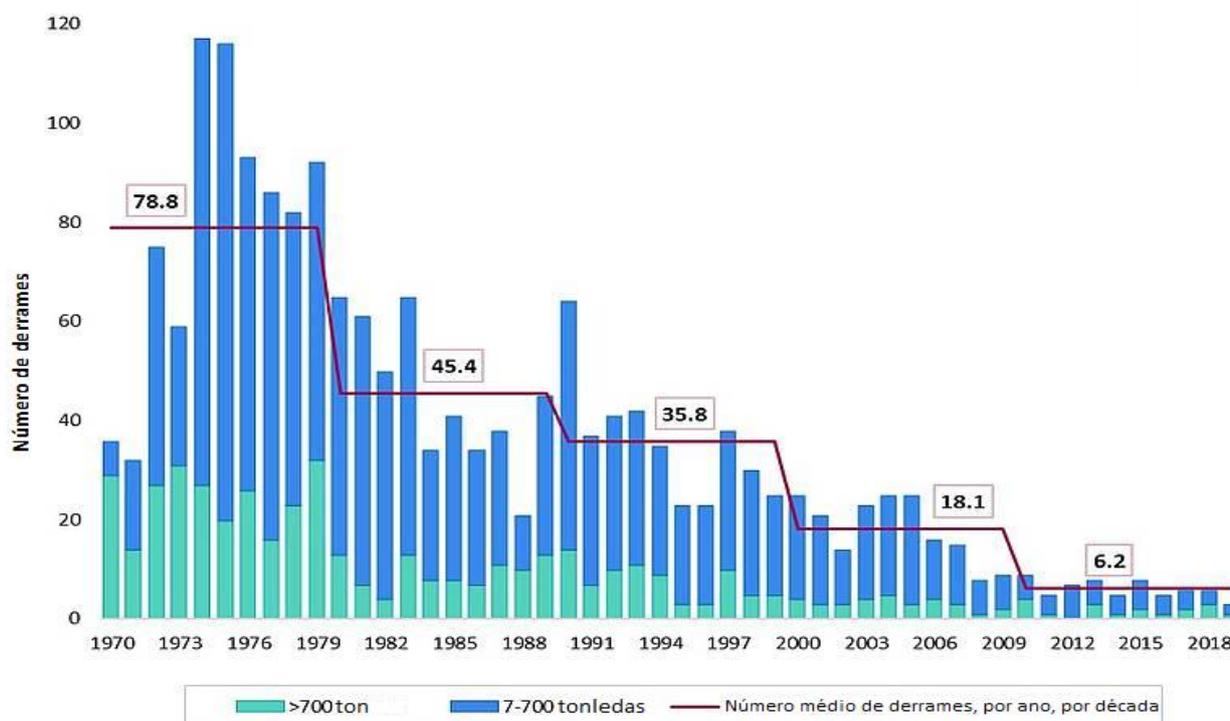
Por meio de um levantamento, agora realizado em 2019, pela International Tanker Owners Pollution Federation - ITOPF foi constatado 3 vazamentos, naquele ano, no mundo, ou seja, um grande derramamento de óleo (> 700 toneladas) e dois derrames médios (7 a 700 toneladas). O grande derramamento ocorreu na América do Norte em maio e resultou de uma colisão de embarcações. Ambos os derrames médios ocorreram no sul da Ásia, um resultou de uma colisão e o outro navio afundou parcialmente em circunstâncias desconhecidas. O derrame de óleo que contaminou aproximadamente 3.000 km de costa em onze estados do Brasil, amplamente divulgado, ainda é um mistério e pode mudar as estatísticas deste ano se confirmado que o derrame proveio de um navio-tanque (ITOPF, 2019).

O volume total de petróleo derramado acidentalmente no meio ambiente registrado em 2019 foi de aproximadamente 1.000 toneladas; a mesma quantidade registrada em 2012 e o menor valor anual registrado nas últimas cinco décadas. Nos últimos 50 anos, as tendências notificadas para derramamentos de óleo marinho oriundos de navios-tanque foram excepcionalmente positivas, mostrando acentuado movimento descendente ao longo das décadas, como ilustrado na Figura 2, sobre o número de derrames (> 7 toneladas) no período compreendido entre 1970 a 2019.

Na maioria das vezes, as descargas de petróleo e de seus derivados no mar se dá por lavagens de tanques de navios petroleiros. Após a descarga do produto, os tanques são cheios com a água do mar (água de lastro), para que seja mantida a estabilidade do navio. Antes de fazer uma nova carga com produto, essa água é descartada no mar, e com ela são descartados óleos residuais (PETERS et

al., 2005; ITOPF, 2013). Outra forma, bem mais drástica, se dá pelo vazamento de produto por naufrágios decorrentes de rupturas na estrutura do navio. Em regiões próximas a terminais portuários há grande susceptibilidade a esses derrames (PEREIRA et al., 2009).

Figura 2: Número de derrames (> 7 toneladas) de 1970 a 2019

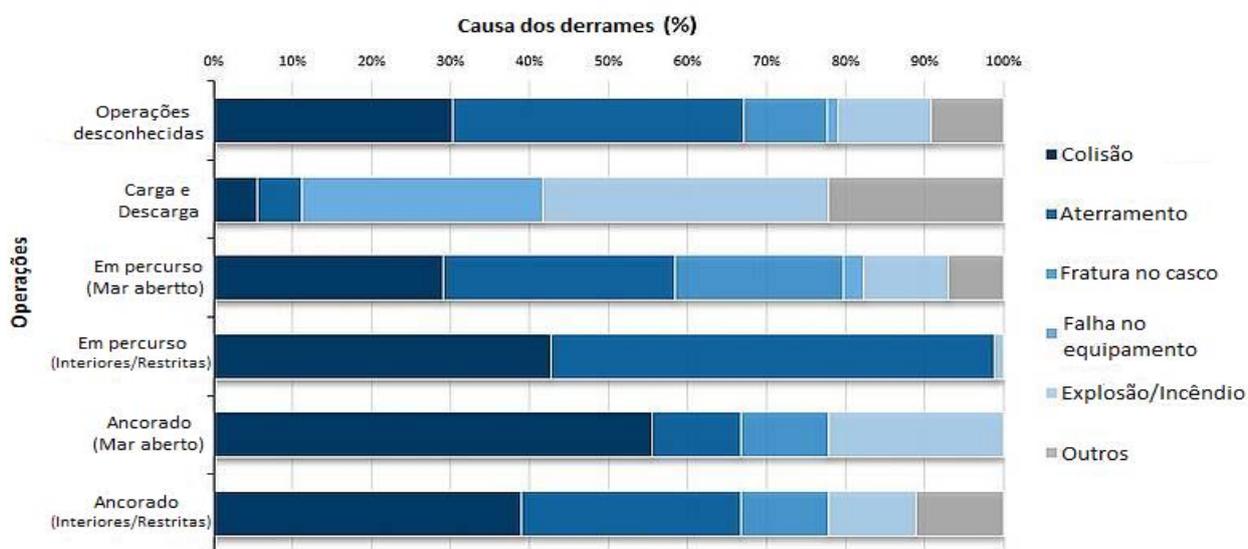


Fonte: Oil Tanker Spill Statistics - www.itopf.com (2019)

O número dos derrames em larga escala (> 700 toneladas) diminuíram significativamente nas últimas décadas e, desde 2010, é em média 1,8 ton. por ano. Da mesma forma, houve um decréscimo significativo na quantidade de óleo derramado ao longo das décadas (ITOPF, 2019).

No período compreendido entre 1970 a 2019, 50% dos derrames em larga escala ocorreram enquanto os navios estavam navegando em águas abertas, mas, também, através das colisões e aterramentos que são responsáveis por 58% das causas desses derramamentos. Essas mesmas causas são responsáveis por uma porcentagem ainda maior dos acidentes ambientais em decorrência de um vazamento por petróleo (99%) quando os navios estavam navegando em águas interiores ou restritas. A Figura 3 mostra a incidência dos derrames por operação no momento do incidente e a causa principal do derramamento entre 1970-2019.

Figura 3: Incidência dos derrames (> 700 toneladas) por operação no momento do incidente e a causa principal do derramamento, 1970-2019



Fonte: Oil Tanker Spill Statistics - www.itopf.com (2019)

O óleo derramado no mar pode permanecer por mais ou menos tempo em uma determinada área, dependendo das correntes marinhas, da sua composição química e de uma série de fatores, tais como: Fatores físicos - sendo um dos mais importantes a turbulência da água; Fatores químicos – especial atenção é dada ao fenômeno da foto-oxidação e aos fatores biológicos, sobretudo a biodegradação (PEREIRA et al., 2009). Esse conjunto de fatores e condições determinará o percurso do petróleo no mar, bem como seu grau de ecotoxicidade e seu tempo de persistência no ambiente marinho (ATLAS, 1984).

Sendo assim, a biorremediação é efetiva apenas onde as condições ambientais permitem o crescimento e a atividade microbiana, então sua aplicação frequentemente envolve a manipulação de parâmetros ambientais a fim de permitir um crescimento microbiano e degradação mais rápida do contaminante. Apesar de normalmente os microrganismos estarem presentes no ambiente contaminado, eles podem não estar em quantidade suficiente para biorremediação no local, devendo seu crescimento e atividade serem estimulados (VIDALI, 2001). Neste caso, a biorremediação se dá por modificações ambientais, com a adição de nutrientes contendo compostos nitrogenados e fosforados no ambiente a fim de superar os fatores que limitam a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos (ATLAS, 1995.a).

2.1.1. Derrames acidentais de petróleo na Bacia de Campos

A Bacia de Campos é uma bacia sedimentar brasileira que está localizada ao longo da costa norte do Rio de Janeiro e no litoral sul do Estado do Espírito Santo, aproximadamente ao sul da margem leste brasileira, ocupando uma área marinha de aproximadamente 100 mil quilômetros quadrados. Os limites da bacia são o arco Vitória, para o norte, o arco de Cabo Frio, para o sul, e as rochas pré-cambrianas da Serra do Mar, para o Ocidente (CARVALHO; ROS, 2015).

O petróleo presente na Bacia de Campos foi formado através da acumulação de restos de organismos marinhos ao longo de milhões de anos. Esse material orgânico foi depositado no fundo do mar e submetido a altas temperaturas e pressão que favoreceram à formação do petróleo. Garoupa foi o primeiro campo a ser explorado na Bacia de Campos, em 1976. Porém o início da produção se deu a partir do campo de Enchova, com uma produção inicial de 10 mil barris diários (bpd). Segundo dados da ANP - Brasil Agência Nacional do Petróleo, as bacias mais importantes são: Badejo, Marlim, Albacora, Roncador, Enchova, Carapeba, Cherne, Bagre, Viola, Corvina, Jubarte, Cachalote, Barracuda, Pampo, Linguado, Trilha e Malhado, de acordo com a Figura 4 (CARVALHO; ROS, 2015).

Figura 4: Bacia de Campos



Fonte: CPRM (2014)

Nesta região, a produção de hidrocarbonetos é realizada em ambiente marinho (*offshore*) e a tecnologia de exploração em águas profundas tem permitido explorar poços a profundidades cada vez maiores. As camadas Pré-Sal são responsáveis por produzir aproximadamente 300.000 boe/dia

(Barris de petróleo/dia) na Bacia de Campos. Essa produção provém dos campos de Jubarte, Baleia Azul, Baleia Franca, Marlim Leste, Caratinga, Barracuda, Marlim, Voador, Albacora Leste, Linguado, Badejo, Pampo e Trilha (ANP, 2017). O que tem contribuído significativamente para que sejam realizadas melhorias na área exploração de petróleo na Bacia de Campos, ao longo dos anos, tanto em campos próximos da costa quanto em regiões consideradas águas profundas (entre 400 e 1000 m) e ultra profundas (superior a 1000 m). O emprego dessas técnicas avançadas visa o aumento da recuperação dos hidrocarbonetos do interior dos reservatórios (CARVALHO; ROS, 2015).

A bacia, atualmente, contém cerca de 57 campos, sendo 52 em fase de produção e cinco em fase de desenvolvimento. Registram-se 4 blocos exploratórios em concessão. De acordo com o Sumário Geológico da ANP, 2017, no mês de março de 2017, a produção diária de petróleo na Bacia de Campos foi da ordem de 1,37 milhões barris e a produção diária de gás natural da ordem de 25 mil Mm³ (ANP, 2017).

Durante a exploração e produção, o óleo é ocasionalmente lançado ao mar como resultado de falhas em linhas ou através de operações de transferência e transporte aos terminais. Os derrames que ocorrem no mar estão diretamente relacionados a intensa transferência entre oleodutos, instalações de armazenamento que operam diariamente em todo o mundo e a falhas humanas na gestão do processo operacional como o acidente ocorrido no campo de Frade, em 7 de novembro de 2011 (IVSHINA et al., 2015).

Um vazamento de óleo, em 7 de novembro de 2011, foi ocasionado a partir de fissuras no leito marinho pequeno descontrole da formação durante a perfuração pela Unidade Marítima de Perfuração Transocean Sedco 706, do poço MUP1-P-ST2-N545D no campo do Frade. No relatório deste dia, o volume inicial estimado pela empresa estava entre 64 e 104 m³ de óleo no mar, conforme a Figura 5 (CONAMA, 2011). Em 14 de novembro de 2011, o volume estimado era maior que o inicial em decorrência do espalhamento da mancha, estima-se em um volume de até 140 m³. A partir deste dia, medidas de engenharia foram adotadas visando ao controle do poço, acarretando uma progressiva redução da mancha. Assim, em 23 de novembro de 2011, o volume da mancha foi estimado em menos de 1 m³ e no último relatório apresentado, dia 4 de janeiro de 2012, estava estimado em cerca de 13,5 litros (CONAMA, 2011).

Figura 5: Vazamento acidental de petróleo do campo de Frade, na Bacia de Campos



Fonte: <https://epocanegocios.globo.com> (2011)

A extração de petróleo no mar, mesmo que estejam acontecendo em menor escala, ainda acarreta impactos ambientais consideráveis ao meio ambiente. A frequência e intensidade com que esses impactos acontecem contribui, significativamente, para a elaboração de pesquisas científicas, cada vez mais avançadas, para compreender os processos bioquímicos que envolvem a degradação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos do mar. O que contribui para desenvolver novas metodologias para a remediação de acidentes com derramamento de petróleo cada vez mais eficazes (IVSHINA et al., 2015).

2.2. Aspectos Ambientais

A inserção de um contaminante derivado do petróleo, indesejavelmente, ao meio traz consigo implicações significativas para os seres humanos e impactos ecotoxicológicos tanto ao solo quanto à água contaminada pelo óleo. (FENT, 2004). A ocorrência de derivados do petróleo, provenientes de algum tipo de derrame, no meio altera todo o ecossistema afetado comprometendo a atividade metabólica dos organismos afetados (ALRUMMAN; PATON, 2015). Causa alterações na quantidade de nutrientes no solo deixando-os inférteis, obstruem a passagem da luminosidade do sol, afetando as algas e organismos planctônicos em suas atividades fotossintéticas, provocam a contaminação de aves que precisam “mergulhar” para buscar alimentos, além de impactar a cadeia alimentar, comprometendo severamente os ecossistemas aquáticos e terrestres. Impactando, diretamente, os pequenos pescadores e suas famílias que dependem da atividade pesqueira para a própria alimentação e obtenção de renda, além dos prejuízos às atividades turísticas caso o derrame chegue à região de praia (ZABBEY et al., 2017; FINOTTI et al., 2009).

A contaminação por petróleo pode se dar tanto por meios físicos como fraturas em tanques em postos de abastecimento, vazamentos em condutos de escoamento, em operações de transportes terrestres (PUGAS, 2015; BAEDECKER et al., 2011; BRAGATO, 2006). Por outro lado, seres humanos também podem contribuir para a ocorrência de vazamentos de óleo em operações de descarga de combustível, falha na vistoria dos reservatórios, intercorrências no transporte (PUGAS, 2015).

Ao longo dos anos petróleo tem sido o principal causador de impactos que comprometem os recursos ambientais indispensáveis ao homem, como o solo e a água (MEYER et al., 2014). Os compostos problemáticos, em relação à contaminação ambiental, fazem parte do grupo BTEX formado por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's) e os monoaromáticos (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno) (JACQUES et al., 2007). Os BTEX são mais solúveis em água e, com isso, apresentam maior mobilidade, o que resulta em maior potencial de migração para águas subterrâneas e consequente contaminação (WEELINK et al., 2010).

Por isso, fazem-se necessárias alternativas visando à remediação das áreas contaminadas por derivados de petróleo. O emprego de técnicas físicas, químicas e/ou biológicas de maneira solo ou em conjunto, tem por objetivo remediar a contaminação do óleo a níveis aceitáveis de segurança, de acordo com a legislação exigida em cada país (MEYER et al., 2014).

Uma estratégia para remediar ambientes contaminados é o emprego da biorremediação (MARTINS, 2004). Conforme Das; Chandran (2010), a biorremediação é um método empregado para a remoção e degradação de muitos poluentes ambientais, incluindo os derivados do petróleo. A biorremediação consiste em reações de oxidação ou redução catalisadas biologicamente, envolvendo compostos químicos complexos, com base no desenvolvimento dos microrganismos ou no metabolismo microbiano. Visando ao aumento na biomassa dos microrganismos e consequente brevidade da degradação, dos derivados do óleo, são empregadas fontes externas de nutrição como o NPK além da fonte de carbono, usado como fonte primária de carbono e energia, resultante da sua completa degradação (LAHEL et al., 2016).

2.2.1. Legislação Ambiental

Dado o número crescente de impactos acarretados a partir das atividades de exploração e produção de petróleo e seus derivados, leis ambientais foram implementadas visando proteger o meio ambiente e minimizar as consequências das ações devastadoras provocadas pelo homem em virtude das crescentes demandas industriais por insumos. A Lei nº 9.478, de 6 de agosto de 1997 que dispõe

sobre a política energética nacional institui o Conselho Nacional de Política Energética cujo objetivo é proteger o meio ambiente e promover a conservação de energia. Atrelado a esse objetivo, orienta ao concessionário deveres que devem ser seguidos visando a um desenvolvimento sustentável e à utilização consciente do meio, como: a adoção de medidas necessárias para a conservação dos reservatórios e de outros recursos naturais e proteção do meio ambiente e responsabilizar-se por quaisquer danos decorrentes das atividades de exploração devendo ressarcir à ANP ou à União.

A Lei do Petróleo, Lei 9.478/97, foi gerada a partir da evolução da indústria do petróleo no Brasil e da sua crescente importância tanto para o mercado interno, quanto para o internacional, onde são determinadas regras especiais para o segmento petrolífero. Essa Lei ditava a quebra do monopólio da Petrobrás permitindo que empresas internacionais operacionalizassem em solo nacional, ou seja, prevê que todas as atividades que antes constituíam exclusividade estatal poderão ser objeto de concessão para operação de empresas privadas nacional, desde que estas atendam aos requisitos técnicos, econômicos e jurídicos para a exploração e produção de petróleo. Com a abertura das licitações de campos de petróleo para demais empresas, de acordo com a Lei 9.478/97, o número de acidentes ambientais aumentou, sendo necessária a criação da Lei nº 9.966, de 28 de abril de 2000 que dispõe sobre a prevenção, o controle e a fiscalização da poluição causada por lançamento de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em águas sob jurisdição nacional e dá outras providências. Essa lei estabelece os princípios básicos a serem obedecidos na movimentação de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em portos organizados, instalações portuárias, plataformas e navios em águas sob jurisdição nacional. Dentro da definição da Lei é possível extrair alguns benefícios, como:

- I. Da obrigação ao Poder Público quanto às obrigações de interesse público relacionadas à preservação ambiental;
- II. Do reconhecimento da responsabilidade do agente degradante pelos danos ambientais acarretados em virtude das suas atividades operacionais;
- III. Da obrigação acerca das auditorias ambientais bienais;
- IV. Da legitimidade do Poder Público Federal e Estadual para propor ação ao cumprimento da referida lei.

A Lei 9.966/2000, nacionalmente conhecida como a Lei do Óleo, representou um enorme avanço quanto à preocupação com a degradação no ambiente marinho, pois, determina medidas a serem cumpridas em situações de emergência envolvendo derrames acidentais de petróleo. Por esse

motivo, estruturas portuárias deverão dispor de Planos de Emergência Individuais para incidentes de poluição. Logo, a Lei determina medidas de prevenção, controle e a fiscalização da poluição causada pelo lançamento de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em águas sob jurisdição nacional em uma periodicidade bienal para as auditorias ambientais compulsórias.

Diante do aumento de ocorrências envolvendo derrames de petróleo no meio ambiente aquático e terrestre, o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA lança a resolução nº 265, de 27 de janeiro de 2000, visando estabelecer uma estratégia que vise à segurança e proteção do meio com relação aos impactos ambientais que possam ser ocasionados em atividades relacionadas à Exploração e Produção de petróleo. Para isso, apresenta algumas medidas como: Ações de controle e prevenção em industriais de petróleo em território nacional; Realização de auditorias ambientais em industriais de petróleo e derivados; Planos de emergência para acidentes ambientais causados pela indústria de petróleo e derivados;

Também no ano de 2000, logo após o acidente ocorrido no mês de janeiro na Baía de Guanabara, o CONAMA já havia lançado a Resolução nº 265/00, obrigando a realização de auditorias ambientais compulsórias, em todas as instalações da Petrobras e demais empresas no Estado do Rio de Janeiro. A prática das auditorias compulsórias, devido ao acidente na Baía de Guanabara, RJ, foi ampliada para uma periodicidade bienal, através da aprovação da Lei federal nº 9.966 de 28/04/2000.

Neste âmbito, a Resolução nº 8, de 21 de julho de 2003 do Conselho Nacional de Política Energética, CNPE nº 08/2003, estabelece a política de produção de petróleo e gás natural e define diretrizes para a realização de licitações de blocos exploratórios ou áreas com descobertas já caracterizadas passa a ser de responsabilidade da ANP, de acordo com o Art. 2º, inciso V, selecionar áreas para licitação, adotando eventuais exclusões de áreas por restrições ambientais, sustentadas em manifestação conjunta da ANP, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA e de Órgãos Ambientais Estaduais.

A ANP, responsável em regular as atividades econômicas das indústrias de petróleo no Brasil, também pode incluir cláusulas que visem à preservação e proteção do meio nos contratos de licitações de Bacias de petróleo, como: atribuir como responsabilidade do concessionário a conservação dos reservatórios e de outros recursos naturais, responsabilizando-o por todo e quaisquer danos acarretados ao meio ambiente. Devendo informar, imediatamente, a ocorrência de qualquer derramamento ou perda de petróleo bem como as medidas já tomadas para enfrentar o problema.

Com relação aos danos e prejuízos ambientais acarretados, segundo a ANP:

O Concessionário deverá ressarcir a União e a ANP, nos termos dos parágrafos 2.2 a 2.6, por toda e qualquer ação, recurso, demanda ou impugnação judiciais, júízo arbitral, auditoria, inspeção, investigação ou controvérsia de qualquer espécie, bem como por quaisquer indenizações, compensações, punições, multas ou penalidades de qualquer natureza, relacionados ou decorrentes de tais danos e prejuízos.

As alterações estabelecidas pela ANP nos editais dos Contratos de concessão se deram devido ao atraso nas expedições das licenças ambientais resultando em um impedimento ao início das atividades de explorações e produção de petróleo. Porém, a proteção ambiental nas atividades petrolíferas está diretamente ligada ao Licenciamento Ambiental que é um dos instrumentos da Política Nacional do Meio Ambiente, PNMA, e tem como objetivo agir preventivamente sobre a proteção do bem comum da sociedade - o meio ambiente – e compatibilizar sua preservação com o desenvolvimento econômico-social.

Segundo à Resolução CONAMA 237/97, licenciamento ambiental é um procedimento administrativo pelo qual o órgão ambiental competente licencia a localização, instalação, ampliação e a operação de empreendimentos e atividades utilizadoras de recursos ambientais, consideradas efetiva ou potencialmente poluidoras; ou aquelas que, sob qualquer forma, possam causar degradação ambiental, considerando as disposições legais e regulamentares e as normas técnicas aplicáveis ao caso. No caso do licenciamento das atividades de exploração e produção de petróleo o acompanhamento se dá através da análise de relatórios submetidos ao órgão ambiental e por meio de vistorias.

O CONAMA através da Resolução nº 463, de 29 de julho de 2014, reconhece os benefícios que podem advir da utilização adequada de remediadores na recuperação de ecossistemas contaminados e no tratamento de resíduos e efluentes em virtude de acidentes ambientais envolvendo vazamentos de petróleo e derivados no meio ambiente. O CONAMA também ressalta que os remediadores podem acarretar desequilíbrio no ecossistema e danos ao meio ambiente. Por este motivo, fazem-se necessárias pesquisas científicas destinadas ao estudo da remediação do óleo derramado no meio ambiente.

2.3. Biodegradação dos hidrocarbonetos

A sustentabilidade pode ser definida como a relação de equilíbrio entre os interesses do homem e o meio ambiente. O termo sustentabilidade surge da necessidade de fazer sensibilizar seres humanos que fazem uso do meio sem levar em consideração as gerações futuras. Uma vez que, o conceito de sustentabilidade refere-se ao explorar consciente de forma a permitir que recursos naturais não se esgotem. De maneira geral, a sustentabilidade representa algo positivo e bom (BARBOSA; DRACH; CORBELLA, 2014; BAÑON GOMIS et al., 2011).

A biodegradação é uma técnica sustentável, pois, se dá a partir de uma variedade de espécies de microrganismos capazes de degradar os compostos do petróleo utilizando-os como fonte de carbono e energia contribuindo para um equilíbrio entre os interesses humanos e o meio ambiente (BARBOSA; DRACH; CORBELLA, 2014; CONAMA, 2014). A biodegradação aeróbica é a mais expressiva e a que apresenta resultados mais eficientes, pois, se dá por alterações nas estruturas moleculares dos compostos orgânicos gerando como produto dióxido de carbono, água (fruto da respiração celular) e energia. Com isso, microrganismos vem sendo largamente empregados no uso da degradação dos componentes do petróleo no meio ambiente (COOKSON, 1995).

A biodegradação é influenciada diretamente por fatores químicos, físicos (temperatura) e biológicos e a união de tais fatores compreendem os parâmetros que estão relacionados às necessidades vitais dos microrganismos envolvidos na degradação dos compostos orgânicos. As alterações químicas e físicas induzidas na composição de uma mistura de hidrocarbonetos do petróleo são, no geral, conhecidas por intemperismo e o principal processo que provoca essas mudanças é a biodegradação, que envolve a redução da complexidade de compostos químicos por microrganismos. A resistência da mistura de hidrocarbonetos a biodegradação depende das características e quantidade do óleo, da natureza da comunidade microbiana e de uma variedade de fatores no ambiente que influenciam a atividade microbiológica. Em um determinado ambiente os hidrocarbonetos do petróleo podem persistirem indefinidamente, enquanto em outros alguns podem ser totalmente biodegradados dentro de relativamente poucas horas ou dias (ATLAS, 1981).

O processo de biodegradação irá depender dos parâmetros de controle bióticos e das propriedades físicas do óleo (COOKSON, 1995; BAKER; HERSON, 1994). Os fatores que podem ser mencionados são:

- Temperatura: A temperatura varia de ambiente para ambiente e de acordo com a sazonalidade e por isso, altera significativamente as reações bioquímicas relacionadas a fisiologia dos microrganismos

envolvidos. Com isso, microrganismos apresentarão eficiências diferenciadas de acordo com a temperatura do ambiente a que estão inseridos. Por este motivo, espécies de microrganismos crescem e se desenvolvem em temperaturas específicas, como por exemplo: Psicrófilas (5 a 20°C), Mesofílicas (25 a 40°C) e as Termofílicas (40 a 60°C) (SINGH; WARD, 2004);

- Disponibilidade de Oxigênio: Em condições aeróbicas, a biodegradação ocorre mais facilmente. Logo, se há disponibilidade de oxigênio no local, a eficiência da degradação pelos microrganismos será muito maior se comparada a uma degradação processada em um meio isento de oxigênio, ou seja, anaeróbico (PETERS et al., 2007);

- pH: A faixa de pH mais favorável, para a maioria dos microrganismos, situa-se entre 6,0 e 8,0 com um valor ótimo em torno de 7,0, sendo que os fungos são mais tolerantes às condições ácidas. Logo, poucos são os microrganismos capazes de se desenvolverem em ambientes onde o pH encontra-se fora deste limite (VIDALI, 2001);

- Disponibilidade de água: Refere-se à quantidade de água que está disponível para os microrganismos no processo de biodegradação, reprodução e desenvolvimento; A água é importante pois é utilizada diretamente como meio para a ocorrência das reações bioquímicas (PETERS et al., 2005);

- Salinidade: Alta salinidade parece afetar negativamente a atividade microbiana. Logo, a biodegradação é severamente afetada pela elevada concentração salina, observada em ambientes hipersalinos como lagunas (WANG; STOUT, 2007);

- Disponibilidade de nutrientes: Bactérias heterotróficas e fungos, além de uma fonte de carbono, necessitam para o seu crescimento de outros compostos tais como fontes de nitrogênio e fósforo que atuarão estimulando o aumento do número de microrganismos. A ausência dessas moléculas no ambiente pode prejudicar, consideravelmente, o crescimento microbiano. Estudos apontam que a degradação do óleo em água do mar é muito mais rápida e eficiente quando há a adição de compostos à base de nitrogênio e fósforo (VIDALI, 2001);

- Foto-oxidação: Processo que atua sobre os compostos orgânicos gerando como produtos compostos mais polares, tornando-os mais solúveis em água o que corrobora no aumento da eficiência da degradação pelos microrganismos envolvidos (ATLAS, 1981);

- Solubilidade: Quanto maior for a solubilidade do composto orgânico em água, maior será sua biodegradabilidade (PERRY, 1984).

2.4. Biorremediação

Na ocorrência de um derramamento ou vazamento de petróleo, as primeiras providências a serem tomadas são de natureza física (geralmente, remoção mecânica). Em seguida, podem ser utilizados produtos químicos (surfactantes químicos) para dispersão do óleo. Em tese, as técnicas biotecnológicas são utilizadas em um terceiro momento, para a biotransformação do material restante, podendo chegar à mineralização, fenômeno caracterizado pela conversão dos hidrocarbonetos em gás carbônico (CO₂) e água. Tais técnicas podem ser aplicadas *in situ*, ocorrendo no local, a exemplo da atenuação natural, bioaugmentação e bioestimulação e, *ex situ*, onde o material é tratado fora do local (PEREIRA et al., 2009).

A biorremediação é um processo de atenuação natural de poluentes do óleo e conseqüentemente uma solução “limpa” (ATLAS, 1995.b). Os resíduos orgânicos são degradados biologicamente sob condições controladas a um estado inofensivo ou a níveis abaixo dos limites de concentração estabelecido pelas autoridades (MUELLER et al., 1996). Consiste na otimização das condições ambientais para o desenvolvimento da ocorrência natural de microrganismos degradadores através da adição de nutrientes e manutenção das condições aeróbicas, se definido como necessário (CLAUDE-HENRI, 2003). A técnica de biorremediação faz uso da ocorrência natural de bactérias e fungos, do próprio local da contaminação ou introduzidos de outros locais, ou plantas para degradar ou desintoxicar substâncias tóxicas à saúde humana e ao meio ambiente, e a degradação de um composto é resultante das ações de múltiplos organismos. Os contaminantes são transformados, em estruturas menos complexas, pelos organismos vivos através de reações que fazem parte de seus processos metabólicos (VIDALI, 2001). Durante a biorremediação, hidrocarbonetos do petróleo são convertidos por microrganismos a dióxido de carbono, água, células bacterianas (biomassa) e matéria orgânica pelo processo de biodegradação (SINGH; WARD, 2004). O controle e otimização do processo de biorremediação é um sistema complexa de muitos fatores envolvidos. Esses fatores incluem a existência de uma população microbiana capaz de degradar os poluentes, a disponibilidade dos contaminantes a população microbiana, os fatores ambientais (tipo de solo, temperatura, pH, a presença de oxigênio ou outros aceptores de elétrons e nutrientes) (VIDALI, 2001). A biorremediação pode apresentar vantagens, como: ser uma técnica de baixo custo, não causar distúrbios ambientais e ser capaz de recuperar, por completo, áreas contaminadas por petróleo, como o emprego da técnica para a mitigação do impacto ambiental ocasionado pelo petroleiro da Exxon Valdez em 1989 (HOSTETTLER; KVENVOLDEN, 1994) e desvantagens, como: ter a sua eficiência limitada em virtude da complexidade dos compostos do petróleo, por isso, nem todos os

compostos são biodegradados facilmente, o que acarreta em uma intensa pesquisa científica visando a encontrar mecanismos que tornem a técnica mais eficiente, como visto na Tabela 1. Por este motivo, deve-se analisar muito bem o ambiente onde a técnica será empregada (COOKSON, 1995).

Tabela 1: Vantagens e Desvantagens no emprego da biorremediação

| Vantagens | Desvantagens |
|---------------------------------|---|
| Técnica rápida e de baixo custo | Toxicidade dos poluentes |
| Mínimo distúrbio ambiental | Intensa pesquisa de biorremediação |
| Elimina custos de transporte | A técnica pode não ser apropriada |
| Não remove água de aquífero | Nem todos os compostos são degradados |
| Aceitação pública | Monitoramento intensivo |
| Recuperação da área contaminada | Produção de compostos poucos conhecidos |

Fonte: Modificado de Cookson (1995)

A técnica de biorremediação pode ser conduzida através dos processos de bioaugmentação, bioestimulação, bioventilação, dentre outras técnicas de biorremediação existentes (LINDSTROM et al., 1991). A bioaugmentação visa uma aceleração do processo de degradação a partir da introdução de microrganismos não indígenas (alóctones), oxigênio, água e nutrientes ao ambiente contaminado (SANTAS et al., 1999; MERLIN et al., 1994; HOFF, 1993; ATLAS; BARTHA, 1992). A bioestimulação consiste na adição de nutrientes para aumentar a taxa de biodegradação. Portanto, para fazer uso do processo de bioestimulação, é necessário que haja no local contaminado uma comunidade natural de microrganismos capaz de biodegradar os contaminantes presentes e que as condições ambientais sejam insuficientes para se obter altas taxas de atividade microbológica dessa população (HOFF, 1993; VENOSA et al., 1991). Por outro lado, a bioventilação envolve o fornecimento de ar (oxigênio) e nutrientes em solos contaminados a fim de estimular a população de bactérias. A bioventilação emprega baixas taxas de fluxo de ar e fornece apenas a quantidade de oxigênio necessária para biodegradação enquanto minimiza a volatilização e liberação de contaminantes para atmosfera. É aplicada para hidrocarbonetos simples e pode ser usada onde a contaminação é profunda sob a superfície (VIDALI, 2001).

Trabalhos vem sendo realizados com o objetivo de obter um maior conhecimento sobre a técnica da biorremediação. De acordo com Alencar e colaboradores (2016), os derrames de petróleo em áreas próximas a manguezais, restingas, por exemplo, são fontes potenciais para entrada de contaminantes como metais pesados e hidrocarbonetos. Esses contaminantes causam diversos efeitos negativos e afetam o equilíbrio do bioma. Porém pode-se inferir sobre o potencial biorremediador de diversas espécies residentes de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs), em comunidades de solos

halófilos de restinga, como participantes dos processos micorrizorremediadores de solos poluídos por óleo (ANDRADE et al., 2015). O emprego da técnica de biorremediação de uma área impactada deve ocorrer, somente, após a realização de estudos criteriosos dos fatores físicos, químicos e biológicos presentes na região impactada (WEBER; SANTOS, 2013).

3. METODOLOGIA

A estratégia de pesquisa utilizada para o desenvolvimento deste trabalho baseia-se em uma metodologia exploratória descritiva, com revisão bibliográfica por meio de pesquisa de artigos científicos na base de dados Google Acadêmico, Periódicos Capes e outros anais de comunicação. Foram identificados 74 artigos relacionados ao tema, onde 52 artigos foram considerados devido à afinidade com a pesquisa. Nesta etapa foram utilizados como operadores booleanos os termos: “Biorremediação”; “Bioestimulação”; “Leis Ambientais”; “Petróleo”; “Derrames de Petróleo”; “Acidentes ambientais”; “Bacia de Campos”. Além das publicações técnicas e acadêmicas relacionadas ao tema, foram feitos contatos por meio de ligações e e-mails com representantes de instituições públicas, para ter um maior conhecimento acerca do tema proposto e da aplicabilidade do mesmo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É notória a importância do petróleo como fonte de energia para o mundo, além de contribuir expressivamente para a geração de emprego e renda para a sociedade. Sua não utilização como fonte de energia é, ainda hoje, algo que não se pode imaginar, pois, não existe uma outra matriz energética capaz de proporcionar os ganhos que são obtidos a partir dos derivados do petróleo, uma vez que são inúmeras as indústrias que os utilizam. Entretanto, as atividades relacionadas ao setor estão sujeitas a causar impactos tanto ambientais em decorrência de acidentes ocasionados pela falta de orientação específica acerca dos riscos dessas atividades como à sociedade uma vez que são inúmeras as pessoas que dependem do meio ambiente para obtenção de lucro, como, por exemplo, os pescadores que tem suas atividades afetadas quando ocorre algum vazamento de petróleo no mar.

O desenvolvimento sustentável está relacionado à simbiose entre os interesses do setor petrolífero e o meio ambiente, ou seja, gerar lucro causando o mínimo de impactos ambientais possíveis. Para isso, faz-se necessária a presença do direito ambiental atuando frente às atividades que sejam capazes de causar perigo ao meio ambiente. Neste sentido, leis ambientais são criadas com

o objetivo de atuar na fiscalização visando impedir que acidentes ambientais ocorram e, se ocorrerem, punir os responsáveis legais pela contaminação ocasionada.

O grande problema da legislação ambiental brasileira é que ela age em defesa contra perigos iminentes e/ou na reparação dos danos ambientais já ocorridos. Um exemplo foi a promulgação da Lei nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, também conhecida como Lei do Petróleo, responsável em retirar o monopólio da Petrobrás sobre os blocos de exploração das bacias sedimentares brasileiras. Ou seja, essa Lei permitiu que indústrias internacionais e nacionais tivessem igual direito em competir pelos blocos junto à Petrobrás. O que acarretou o aumento de acidentes ambientais gerados a partir da contaminação de óleo *in natura*. O grande estopim foi o acidente gerado na Baía de Guanabara, RJ, em 18 de janeiro de 2000, levando a necessidade da criação de leis, normas, como a Lei nº 9.966, de 28 de abril de 2000 e as resoluções do CONAMA cujo objetivo principal era a prevenção, o controle e a fiscalização da poluição causada por lançamento de óleo. Então, o problema está nas leis brasileiras não atuarem, antecipadamente, de forma preventiva, ou seja, com o intuito de preservar e proteger os recursos naturais, impondo que estes venham a ser utilizados, sempre, de maneira consciente, levando em consideração à qualidade de vida e os interesses da sociedade e o meio ambiente.

Dentro do contexto de preservação ambiental, a biorremediação ganha espaço, pois, trata-se de uma técnica capaz de reduzir a concentração do contaminante sem causar danos ao meio ambiente e por ser de baixo custo. A técnica tem sua eficiência diretamente afetada por parâmetros de controle bióticos e pelas propriedades físicas do óleo e pode ser melhorada através da bioestimulação que se dá a partir da utilização de nutrientes, como, por exemplo, o NPK (10:10:10), que favorecem o aumento da população de microrganismos capazes de degradar o poluente. O que faz da biorremediação uma técnica eficaz e eficiente na descontaminação do meio ambiente por derivados de petróleo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, T. D. S. et al. Contaminação por metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo: uma ameaça para os manguezais. *Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego*, v. 10, n. 2, p. 7, 30 dez. 2016
- ANDRADE, O. F. et al. Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) em Uma Formação Vegetal de Restinga: Ecologia e Potencial para Micorriorremediação de Hidrocarboneto do Petróleo. *Revista Vértices*, v. 17, n. 3, p. 7–33, 30 dez. 2015
- ANP. Agência Nacional de Petróleo. *Exploração e produção de óleo e gás*, 2017. Acessado no dia 06 de junho de 2020. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/exploracao-e-producao-de-oleo-e-gas/>>.
- ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiology*, v.45, n.1, p.180-209, 1981.
- ATLAS, R. M. *Petroleum Microbiology*. New York. Macmillan Publishing Company, 1984.
- _____. Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Elsevier, v. 35, n. 1, p. 317–327, 1995.a.
- _____. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, Elsevier, v. 31, n. 4, p. 178–182, 1995.b.
- ATLAS, R. M., HAZEN, T. C. *Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History*. Environmental Science and Technology, 2011.
- ATLAS, R. M., BARTHA, R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Advances in Microbial Ecology*, v.12, n.1, p.287-338, 1992.
- BAÑON GOMIS, A. J. et al. Rethinking the Concept of Sustainability. *Business and Society Review*. v. 116, n. 2, p. 171-91, 2011.
- BAKER, K. H., HERSON, D. S. *Bioremediation*. [S.l.]: McGraw-Hill, Inc., 1994.
- BARBOSA, G. S.; DRACH, P. R.; CORBELLA, O. D. A Conceptual Review of the Terms Sustainable Development and Sustainability. *International Journal of Social Sciences*. v. III, n. 2, 2014.

CARVALHO, A. S. G., ROS, L. F. Diagenesis of Aptians and stones and conglomerates of the Campos Basin. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 2015.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. *Gerenciamento de áreas contaminadas: investigação para remediação no Estado de São Paulo*. Dezembro de 2012. Acessado no dia 06 de junho de 2020. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/relacoes-de-areascontaminadas/15_publicacoes>.

CLAUDE-HENRI, C. *Bioremediation of oil-based drill cuttings under tropical conditions*. In: SPE13th Middle East Oil Show&Conference. Bahrain. [S.l.: s.n.], p. 5–8, 2003.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2011. Acessado no dia 06 de junho de 2020. Disponível em:< <http://www.conama.com.br>>.

COOKSON, T. *Bioremediation Engineering: Design and Application*. McGraw-Hill Inc, New York, 1995.

CPRM. Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais. 2014. Acessado em 26 de junho de 2020. Disponível em: <<https://www.cprm.gov.br/publique/Redes-Institucionais/>>.

EPA, A. *Use of monitored natural attenuation at superfund, rcra corrective action, and underground storage tank sites*. United States Environmental Protection Agency, Washington, 1999.

FIGUEIREDO, L. H. M. *Investigação das Contribuições Orgânicas Antrópicas e Naturais em Sedimentos Costeiros Utilizando-se Hidrocarbonetos Marcadores*. Tese de Doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC, 1999.

FLOODGATE, G. D. The fate of petroleum in marine environments. *Petroleum Microbiology*. v.1, n.1, p. 35-80, 1984.

HOFF, R. Z. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup, *Marine Pollution Bulletin*, v.26, n.9, p.476-481, 1993.

HOSTETTLER, F.D., KVENVOLDEN, K.A. Geochemical changes in crude oil spilled from the Exxon Valdez supertanker into Prince William Sound, Alaska. *Org. Geochem.* v. 21, n. 8/9, p. 927-936, 1994.

HUNT, M. *Petroleum geochemistry and geology*. [S.l.]: WH Freeman and company, 1979.

ITOPF. International Tanker Owners Pollution Federation Limited, 2013. Acessado no dia 05 de junho de 2020. Disponível em: <<http://www.itopf.com/marine-spills/fate/weathering-process/>>.

ITOPF. _____. 2015. Acessado no dia 26 de maio de 2020. Disponível em: <<http://www.itopf.com/marine-spills/fate/weathering-process/>>.

ITOPF. _____. 2019. Acessado no dia 14 de junho de 2020. Disponível em: <<https://www.itopf.org/knowledge-resources/>>.

IVSHINA, I. B., KUYUKINA, M. S., KRIVORUCHKO, A. V., ELKIN, A. A., MAKAROV, S. O., CUNNINGHAM, C. J., PESHKUR, T. A., ATLAS, R. M., PHILP, J. C. Oil spill problems and sustainable response strategies through new technologies. *Environmental Science: Processes & Impacts*, Royal Society of Chemistry, v.17, n.7, p.1201–1219, 2015.

JOHNSEN, A. R., WICK, L.Y., HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, Oxford, v.133, n.1, p.71-84, 2005.

LINDSTROM, J. E., PRINCE, R. C., CLARK, R. C., GROSSMAN, J. C., YEAGER, T. R., BRADDOCK, J. F., BROWN, E. J. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. *Appli. Env. Micro*, v.57, n.1, p.2514-2522, 1991.

MERLIN, F. X., LEE, K., SWANNEL, R., OUTDOT, J., BASSERES, A., RELLY, T., CHAUERY, C., DALMAZZONE, C., SVEUM, P. *Protocol for experimental assessment of bioremediation agents on a petroleum polluted shoreline*. Proceeding of the 17th Arctic and Marine Oilspill Program (AMOP) Technical Seminar, n.1, p.465-478, 1994.

MORGAN, P., WATKINSON, R. J. Biodegradation of Components of Petroleum. In: Ratledge, C. (ed.) *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, v.1, p. 1-27. 1994.

MUELLER, J. G., CERNIGLIA, C. E., PRITCHARD, P. H. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology Research Series*, v. 6, p. 125–194, 1996.

PEREIRA, J. N., GOMES, E. B., SORIANO, A. U. *Biodegradação de Hidrocarbonetos*. Escola de Química/UFRJ; FAPERJ; CNPq; PETROBRAS, 2009.

PERRY, J. *Microbial metabolism of cyclic alkanes*. Macmillan, 1984.

PETERS, K. E., WALTERS, C. C., MOLDOWAN, J. M. *The biomarker guide: biomarkers and isotopes in the environment and human history*. [S.l.]: Cambridge University Press, 2005.

PETERS, K. E., WALTERS, C. C., MOLDOWAN, J. M. *The biomarker guide: volume 2, biomarkers and isotopes in petroleum systems and earth history*. [S.l.]: Cambridge University Press, 2007.

RAJAKARUNA, N., TOMPKINS, K. M., PAVICEVIC, P. G. Phytoremediation: na affordable green technology for the clean-up of metal contaminated sites in sri lanka. *Ceylon J Sci, Citeseer*, v.35, p.25–39, 2006.

ROCHA, C. L. *Análise de fronteiras de reservatório de petróleo através de geoquímica de superfície e mineração de dados*. Tese (Doutorado) — UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2005.

ROSA, A. P. ESTUDOS EXPERIMENTAIS DA ANÁLISE DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO NA MITIGAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL. *J. A.*, p. 9, 2006.

RUSSELL, D., JONES, A., DAVIES, P., HARRIS, L., HUMPHREYS, C., WIKINSON, S., HUCKLE, E., DUARTE-DAVIDSON, R., KRISHNA, C. Petroleum hydrocarbons, jp-8 spillage, environmental contamination, community exposure and multi-agency response. *Journal of Environmental Health Research*, v. 9, p. 53–59, 2009.

SANTAS, R., KORDA, A., TENENTE, A., BUCHHOLZ, K., SANTAS, P. Mesocosm assays of oil spill bioremediation with oleophilic fertilizers: Inipol, F1. *Marine Pollution Bulletin*, v.38, n.1, p.44-48, 1999.

SCIENTIFIC AMERICAN. 2010. Acessado no dia 02 de julho de 2020. Disponível em: <<https://www.scientificamerican.com/article/how-microbes-clean-up-oil-spills/>>.

SINDIPETRO-NF. 2019. Acessado no dia 06 de junho de 2020. Disponível em: <<https://sindipetronf.org.br/fpso-aderna-na-bacia-de-campos/>>.

SINGH, A., WARD, O. P. Applied bioremediation and phytoremediation (series: Soil biology, vol 1). *Journal of Soils and Sediments*, Springer, v.4, n.3, p.209–209, 2004.

TISSOT, B. P., WELTE, D. H. *Petroleum formation and occurrence*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2013.

THOMAS, J. E. *Fundamentos de engenharia de petróleo*. [S.l.]: Interciência, 2001.

VASCONCELLOS, S. P. *Atividades enzimáticas e de biodegração de microorganismos do petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul)*. 2006. 249p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP.

VENOSA, A. D., HAINES, J. R., NISAMENEPPONG, W., GOVIND, R., PRADHAN, S., SIDIQUE, B. Screening of commercial inoculate for efficacy on stimulating oil biodegradation on closed laboratory system. *Journal Haz. Materials*, v.28, n.1, p.131-144, 1991.

VIDALI, M. Bioremediation. an overview. *Pure and Applied Chemistry*, Blackwell Science; v.73, n.7, p.1163–1172, 2001.

WANG, Z., YANG, C., FINGAS, M., HOLLEBONE, B., PENG, X., HANSEN, A. B., CHRISTENSEN, J. H. Characterization, weathering, and application of sesquiterpanes to source identification of spilled lighter petroleum products. *Environmental science & technology*, ACS Publications, v.39, n.22, p.8700–8707, 2005.

WANG, Z., STOUT, S. A. *Oil Spill Environmental Forensics: Fingerprinting and Source Identification*. [S.l.]: Academic Press, 2007.

WEBER, B. D.; SANTOS, A. A. Utilização da biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados. v. 10, n. 1, p. 20, 2013

WENGER, L. M., DAVIS, C. L., ISAKSEN, G. H. *Multiple controls on petroleum biodegradation and impact on oil quality*. In: SOCIETY OF PETROLEUM ENGINEERS. SPE Annual Technical Conference and Exhibition. [S.l.], 2001.

WENGER, L. M., DAVIS, C. L., ISAKSEN, G. H., Multiple controls on petroleum biodegradation and impact in oil quality. *SPE Reservoir Evaluation and Engineering*, p.375–383, 2002.

WHITESIDE, S. E. *Biodegradation studies of Saudi Arabian crude oil*. *Annual Technical Conference and Exhibition of the Society of Petroleum Engineers*. SPE. v.1, n.1, p.281-287, 1993.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE BIORREMEDIAÇÃO NA ATENUAÇÃO DE UM ÓLEO
PROVENIENTE DA BACIA DE CAMPOS/RJ**

*EVALUATION OF THE BIOREMEDIATION TECHNIQUE IN THE ATTENUATION OF AN OIL
FROM THE CAMPOS BASIN/RJ*

Alexsandro da Silva Alves - IFFluminense/PPEA

Angélica da Cunha dos Santos - IFFluminense/PPEA

RESUMO

A técnica de biorremediação pode ser aplicada para amenizar diversos impactos ambientais. Dentre eles, os gerados por derivados do petróleo por meio da introdução de microrganismos no ambiente contaminado, organismos exógenos, ou criando condições favoráveis para que possam se desenvolver e degradar o poluente. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar, em laboratório, o emprego da técnica de biorremediação durante 21 dias usando o petróleo da Bacia de Campos/RJ. A metodologia aplicada consistiu no arranjo de 12 unidades de simulação, com e sem a adição do fertilizante NPK, com o objetivo de verificar a sua influência na biodegradação dos compostos saturados e aromáticos do petróleo. O monitoramento da biodegradação foi realizado a partir de razões diagnósticas obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG/EM). A partir das razões obtidas, foi possível fazer uma avaliação da biodegradação dos compostos saturados, sem e com a influência dos compostos aromáticos. Os resultados mostraram que o estimulante NPK agiu de forma positiva estimulando a atividade microbiana a degradar uma maior fração dos componentes do petróleo e, também, atuou favoravelmente reduzindo a concentração de compostos biomarcadores, que são conhecidos por sua estabilidade atômica. Foi possível constatar que os compostos aromáticos dificultam a biodegradação dos compostos saturados por sua toxicidade, estabilidade, complexidade estrutural, dentre outros. Porém, também ficou evidenciado que os microrganismos, na escassez de estruturas menos complexas, ou seja, compostos saturados lineares, começam a degradar estruturas mais complexas, compostos aromáticos, saturados cíclicos e biomarcadores, como forma de obtenção de átomos de carbono (C) para a suas atividades metabólicas principais.

Palavras chave: Biorremediação. Bioestimulação. Derrames de Petróleo. NPK.

ABSTRACT

The bioremediation technique can be applied to mitigate various environmental impacts. Among them, those generated by petroleum derivatives through the introduction of microorganisms into the contaminated environment, exogenous organisms, or creating favorable conditions for them to develop and degrade the pollutant. The objective of this research was to evaluate, in the laboratory, the use of the bioremediation technique for 21 days using oil from the Campos Basin/RJ. The applied methodology consisted of the arrangement of 12 simulation units, with and without the addition of NPK fertilizer, in order to verify its influence on the biodegradation of saturated and aromatic petroleum compounds. Biodegradation monitoring was carried out from diagnostic reasons obtained by Gas Chromatography coupled to a Mass Spectrometer (GC/MS). From the ratios obtained, it was possible to evaluate the biodegradation of saturated compounds, without and with the influence of aromatic compounds. The results showed that the NPK stimulant acted in a positive way, stimulating the microbial activity to degrade a greater fraction of petroleum components and, also, it acted favorably by reducing the concentration of biomarker compounds, which are known for their atomic stability. It was possible to verify that aromatic compounds hinder the biodegradation of saturated compounds due to their toxicity, stability, structural complexity, among others. However, it was also evidenced that microorganisms, in the scarcity of less complex structures, that is, linear saturated compounds, begin to degrade more complex structures, aromatic compounds, cyclic saturated and biomarkers, as a way to obtain carbon atoms (C) for their main metabolic activities.

Keywords: *Bioremediation. Biostimulation. Oil spills. NPK.*

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e naftênicos e outros compostos contendo enxofre, oxigênio, nitrogênio e constituintes organometálicos complexados com níquel e vanádio. (BANERJEE; GHOSHAL, 2017). Dentre esses compostos, destacam-se os biomarcadores ou marcadores biológicos que podem ser relacionadas com moléculas encontradas em organismos vivos que são classificados como alcanos lineares, alcanos ramificados, isoprenoides, cicloalcanos, terpanos, esteranos e aromáticos (HASSAN; ALY, 2018). A concentração absoluta de biomarcadores no petróleo varia amplamente. Os biomarcadores em geral estão presentes em baixas concentrações no óleo cru, a maioria ocorre em uma faixa de 10 a 1000 ppm (0,001 a 0,1 %), se comparados com os principais grupos de hidrocarbonetos, como as n-parafinas. O grupo de biomarcadores, excluindo as n-parafinas e isoprenóides acíclicos, geralmente representa menos que 2 % do óleo total (POHREN et al., 2019).

Acidentes químicos envolvendo hidrocarbonetos totais de petróleo são relativamente comuns principalmente durante a distribuição e transporte do óleo. Com isso a contaminação potencial do ar, água e solos juntamente com a toxicidade dos hidrocarbonetos do petróleo podem ter um impacto significativo sobre a saúde da sociedade (CORDES et al., 2016).

A biorremediação é uma opção que oferece a possibilidade de destruição dos contaminantes ou torna diversos contaminantes inofensivos usando atividade biológica natural e conseqüentemente uma solução sustentável para o problema, reduzindo efeitos ecológicos. Ela possui custo relativamente baixo associado, técnicas de baixa tecnologia que geralmente tem boa aceitação pública e muitas vezes pode ser realizada no local da contaminação (ETCHEPARE et al., 2016).

Entretanto a biorremediação do petróleo e outros hidrocarbonetos é um processo complexo, onde aspectos qualitativos e quantitativos dependem das características e das concentrações de contaminante presente, das condições físicas e químicas do ambiente (como teor de oxigênio, quantidade de nutrientes, umidade e pH), da composição das comunidades de microrganismos autóctones e suas respostas adaptativas a presença de hidrocarbonetos (MAPELLI et al., 2017). Sendo assim, nem sempre será adequado o uso dessa técnica por não ser um processo imediato, ou seja, demandar tempo e o nível de contaminante residual alcançado não ser sempre o adequado. Uma vez que estruturas como compostos de resina e/ou asphaltênicos, por serem mais complexos, demanda de uma maior atividade metabólica dos microrganismos e, conseqüentemente, mais tempo. (KHALIFA, 2017).

Esta pesquisa tem por objetivo analisar a eficácia da técnica de biorremediação na degradação dos componentes das frações de compostos saturados e aromáticos de um petróleo extraído na Bacia de Campos/RJ, por meio da bioestimulação, considerando um período de avaliação de 21 dias. O estudo da biodegração das frações do petróleo é de grande relevância para a indústria petrolífera porque fornece informações importantes acerca de um processo de remediação de um óleo derramado acidentalmente no mar, além de ser uma tecnologia de baixo custo efetivo, não intrusiva e sustentável. O estudo baseou-se em um petróleo produzido na Bacia de Campos na Região Norte Fluminense, mas a metodologia aplicada pode ser replicada em ambientes com características físico-químicas diferenciadas. O trabalho desenvolvido contribuiu para agregar conhecimento aos estudos já existentes acerca do processo de biorremediação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biomarcadores

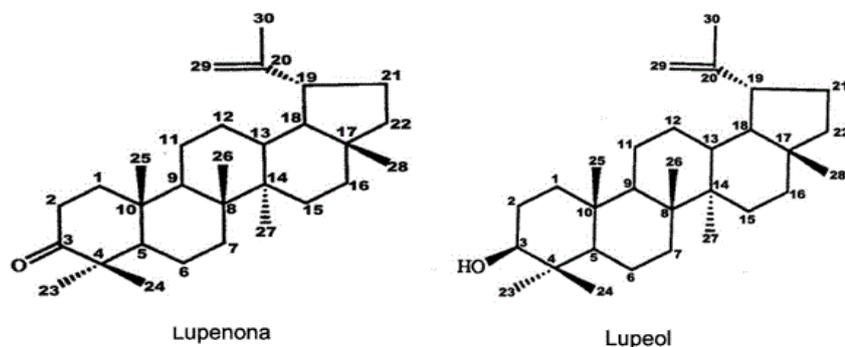
A composição do petróleo consiste, basicamente, de compostos orgânicos que podem ser divididos em classes levando em consideração a sua estrutura molecular (BALKE; BROWN, 2018). Os principais grupos de componentes dos óleos são os hidrocarbonetos saturados, os hidrocarbonetos aromáticos, as resinas e os asfaltenos. Onde os hidrocarbonetos saturados constituem o maior grupo (POULSEN et al., 2018). São também encontradas moléculas complexas chamadas biomarcadores ou marcadores biológicos no qual suas estruturas ou cadeias carbônicas podem ser relacionadas com moléculas encontradas em organismos vivos. Os biomarcadores incluem n-parafinas, porfirinas, isoprenóides, terpenóides e esteroides (O'BRIEN et al., 2018).

Biomarcadores são compostos orgânicos que apresentam alta estabilidade térmica e molecular, o que confere aos compostos desse grupo resistência à degradação. Há, assim, a preservação de sua estrutura original, ou seja, uma espécie de assinatura química, *fingerprint*. O que permite a identificação, de modo preciso, acerca do histórico dos hidrocarbonetos, como grau de intemperismo, existência de biodegração e sua relação com o meio de origem (YANG et al., 2017; SPEIGHT, 2014).

Os terpenóides e isoprenóides são compostos que possuem subunidades de isopreno (alcenos ramificado com cinco átomos de carbono) em sua composição e muitos deles no petróleo são originados da membrana lipídica das bactérias (procariontes). Os terpenóides são divididos em hemiterpanos (C5), monoterpanos (C10), sesquiterpanos (C15), diterpanos (C20) e sestertepanos

(C25) e estas famílias são compostas de uma grande variedade de estruturas cíclicas e acíclicas (HASSAN; ALY, 2018), como pode ser visto na Figura 6.

Figura 6: Estruturas químicas das classes de terpenóides.



Fonte: Figura adaptada (PETERS et al., 2005).

Os hopanos são originados de precursores nas membranas de bactérias assim como maioria dos terpanos. São triperpanos pentacíclicos comumente contendo de 27-35 átomos de carbono em uma estrutura naftênica composta por quatro anéis de seis carbonos e um anel de cinco carbonos. Os terpanos tricíclicos são usados para correlacionar óleos crus e extratos de rochas geradoras, para prever as características da rocha geradora e devido a sua alta resistência biodegradação e maturação termal são também usados para avaliar suas extensões (PETERS et al., 2007).

Compostos derivados de isoprenos são chamados isoprenóides, como o fitano que é o homólogo de maior cadeia na série linear de isoprenóides regulares que se estende de farnesano (C15) através de C16, C17, nospristano (C18) e pristano (C19) a fitano (C20). Fitano e pristano são originados da cadeia lateral do fitol da clorofila durante a diagênese. O pristano assim como outros terpenóides que não obedecem estritamente a regra do isopreno são originados de reações bioquímicas ou outras reações que causam ganho ou perda de substituintes (PATHAK; MANDALIA, 2012; PETERS et al., 2005);

2.2. Microrganismos Degradadores de Petróleo

Uma grande diversidade de bactérias e fungos está associada à degradação de hidrocarbonetos do petróleo, como visto na Tabela 2. Porém, as bactérias são os microrganismos que mais estão envolvidos no processo de degradação dos hidrocarbonetos. Sendo que as mais conhecidas e frequentes são as espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (VARJANI; UPASANI, 2017; BORAH; YADAV, 2017).

Tabela 2: Exemplos de gêneros de bactérias e fungos degradadores de petróleo.

| BACTÉRIAS | FUNGOS |
|---|---|
| <i>Achromobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Anthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> | <i>Acremonium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Cochliobolus</i> |
| <i>Brevibacterium</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> | <i>Fusarium</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Glicodadium</i> , <i>Humicola</i> |
| <i>Flavobacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sarcina</i> | <i>Monilia</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phoma</i> , <i>Saccharomyces</i> |
| <i>Spirillum</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Xanthomonas</i> | <i>Spicaria</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Verticillium</i> |

Fonte: Tabela adaptada (PEREIRA et al., 2009).

Pelo fato de o petróleo ser constituído por uma mistura complexa de compostos orgânicos como n-alcanos, parafinas ramificadas, parafinas cíclicas, compostos aromáticos, compostos nitrogenado, oxigenados e compostos sulfurados, faz-se necessário a interação entre diferentes espécimes de microrganismos, residentes e ajustados às características físico-químicas do meio, capazes de degradar frações específicas do hidrocarboneto (PATEL et al., 2018).

A eficiência da biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo está também intimamente relacionada à interação que ocorre na interface água-óleo, por causa da imiscibilidade das fases aquosa e oleosa. Por este motivo, o acesso dos microrganismos à gota de óleo é bastante dificultado sendo preciso a produção de compostos, pelos microrganismos, conhecidos como biossurfactantes. Compostos orgânicos que contribuem com o aumento da superfície de contato do material oleoso e, conseqüentemente, aumenta a pseudodisponibilidade do hidrocarboneto em água (OYEHAN; AL-THUKAIR, 2017).

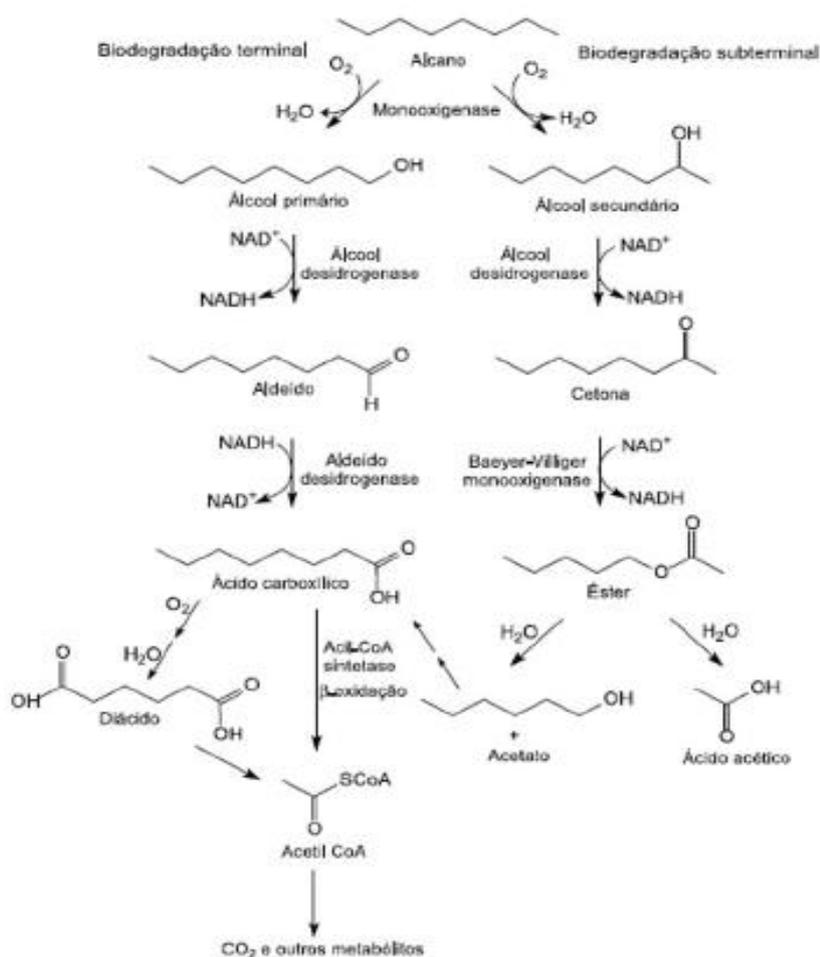
2.3. Vias de biodegradação dos Componentes do Petróleo

A degradação dos compostos do petróleo é conduzida a partir da síntese de enzimas, também conhecidas por “biocatalisadores”, produzidas pelos microrganismos. Essas enzimas são altamente específicas, o que significa que cada uma age como catalisador biológico de apenas uma reação e atuam no controle das reações bioquímicas que irão produzir energia necessária à formação de novos microrganismos (NANCA et al., 2018).

As bactérias, e algumas espécies de fungos, possuem a capacidade de produzir biossurfactantes e a habilidade de se ajustar rapidamente a uma variedade de ambientes. Logo, os microrganismos apresentam uma maior aptidão na degradação da fração mais leve e menos tóxica do petróleo, ou seja, os compostos saturados. Com isso, petróleos mais leves, ou seja, de elevado grau API ($^{\circ}$ API), apresentarão uma maior taxa de biodegradabilidade se comparado com óleos que apresentam frações mais pesadas, como resinas e asfaltenos, e os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) (PEREIRA et al., 2009).

2.3.1. Biodegradação de n-alcenos

Os *n*-alcenos são os principais constituintes dos contaminantes do petróleo e para possibilitar o ataque inicial dos microrganismos a esses hidrocarbonetos alifáticos é indispensável a presença de oxigênio molecular. A oxidação de *n*-alcenos se dá de forma terminal ou subterminal. O mecanismo principal ocorre pela oxidação terminal onde hidrocarbonetos são comumente ativados por monoxigenases que incorpora oxigênio, formando um álcool primário. A oxidação continua no carbono terminal, formando aldeídos e ácidos graxos, que mais tarde é clivado na Beta-oxidação para formação do acetil-Coa utilizado em metabolismos intermediários (PEREIRA et al., 2009; PETERS et al., 2007). Já a oxidação subterminal pode ocorrer em alcenos de cadeias mais curtas (C3 - C6) e longas com a formação de um álcool secundário e uma cetona subsequente, como visto na Figura 7 (FRITSCHER; HOFRICHTER, 2008).

Figura 7: Vias de degradação aeróbica de *n*-alcanos.

Fonte: Figura adaptada (PEREIRA et al., 2009).

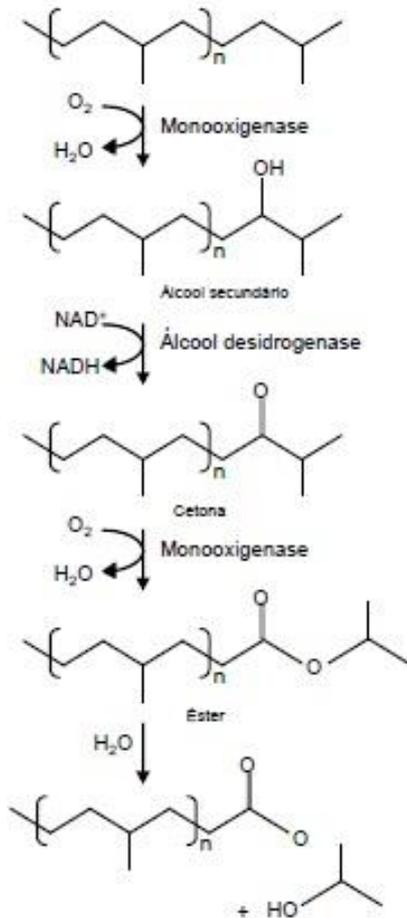
2.3.2. Biodegradação de isoalcanos

Ramificações no geral reduzem a taxa de biodegradação, em particular ramificações de cadeia mais complexa como terc-butil que impede a ação de enzimas no substrato. No entanto, grupos laterais de metil não provocam reduções drásticas (FRITSCHÉ; HOFRICHTER, 2008). Por essa razão, *n*-alcanos e isoalcanos são preferencialmente removidos primeiro durante a biodegradação no óleo cru (PETERS et al., 2007).

A biodegradação de compostos dos isoalcanos por microrganismos aeróbios é iniciada pela ação das oxigenases (mono- ou dioxigenases). A etapa fundamental da biodegradação aeróbica é a adição de um átomo oxigênio, e em alguns casos até dois átomos de oxigênio, ao hidrocarboneto, convertendo o composto em um alanol. Esta oxidação torna os hidrocarbonetos mais solúveis em

água, o heteroátomo acrescido ao hidrocarboneto confere à estrutura uma polaridade permitindo uma maior miscibilidade em água, logo, favorecendo à sua biodegradação. O mecanismo de degradação de isoalcanos pode ser visto na Figura 8 (BERTHECORTI; HÖPNER, 2005).

Figura 8: Mecanismos de degradação aeróbica de isoalcanos.



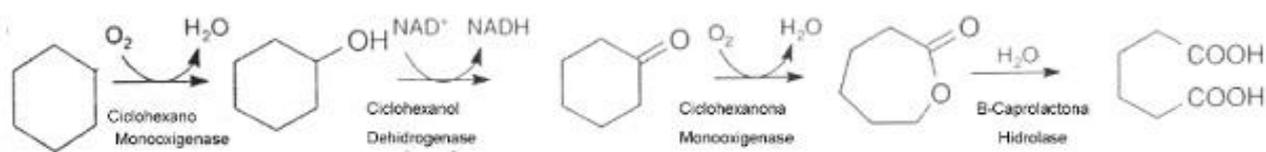
Fonte: Figura adaptada (PETERS et al., 2007).

2.3.3. Biodegradação de Cicloalcanos

Cicloalcanos são bastante resistentes à biodegradação aeróbica. Um mecanismo específico conduz à abertura do anel e à formação de ácido graxo que podem ser posteriormente clivados pela α , β ou θ oxidação para ativação dos cicloalcanos. O mecanismo envolve duas etapas de adição de oxigênio por uma série de enzimas monooxigenases. E como esperado, cicloalcanos com múltiplos anéis são altamente resistentes à biodegradação (PETERS et al., 2007).

A biodegradação aeróbica de n-alcenos cíclicos se inicia pela atividade de uma monooxigenase, a qual introduz um grupo hidroxila na cadeia alifática. Os principais intermediários da degradação de alcanos são ácidos graxos, os quais são produzidos a partir de alcanóis, via aldeídos. Estes ácidos podem ser decompostos por rotas biossintéticas típicas de degradação de ácidos carboxílicos, em que a molécula é quebrada em ácidos menores. Ácidos graxos podem servir como fontes de carbono para bactérias de uma comunidade, favorecendo ao incremento da degradação de hidrocarbonetos, como visto na Figura 9 (BERTHECORTI; HÖPNER, 2005).

Figura 9: Degradação aeróbica do ciclohexano.



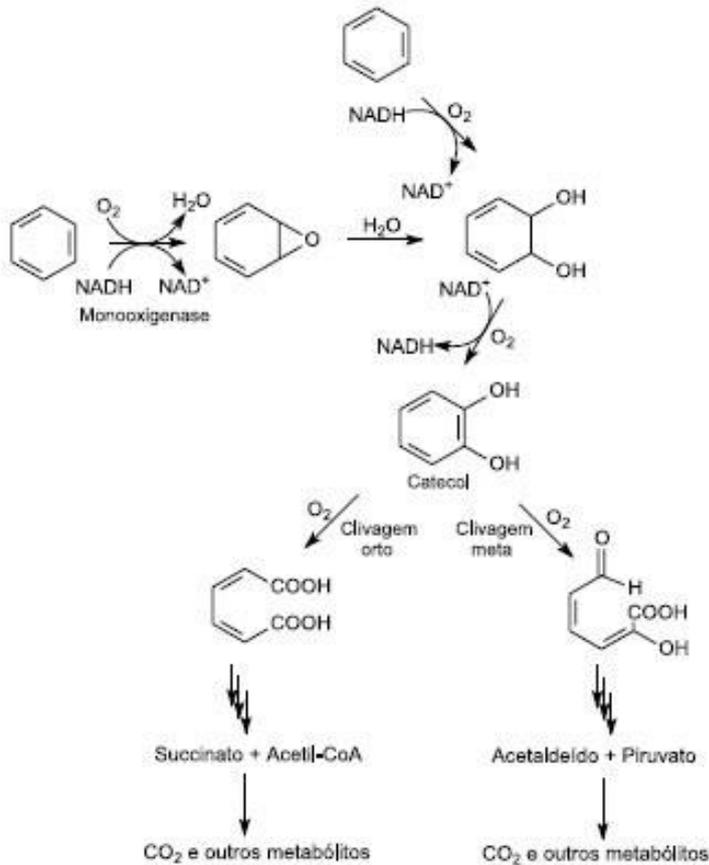
Fonte: PETERS et al., (2007).

2.3.4. Biodegradação de aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos caracterizam-se por possuir uma elevada energia de ressonância do anel benzênico, que resulta em considerável estabilidade termodinâmica da molécula. Esta estabilidade, por sua vez, reflete-se nas demais propriedades químicas, diferenciando, marcadamente, os referidos compostos dos hidrocarbonetos saturados (ATLAS; HAZEN, 2011). A biodegradação dos compostos aromáticos pode variar desde simples oxidação, passando pela formação de compostos intermediários, até a sua metabolização completa nas células (PEREIRA et al., 2009; FRITSCHÉ; HOFRICHTER, 2000).

A biodegradação dos compostos aromáticos inicia-se pela atividade enzimática de uma monooxigenase ou dioxigenase, havendo a adição de um ou dois átomos de oxigênio no substrato. A molécula é oxidada formando um diol, havendo a subsequente clivagem do anel. Piruvato é um dos principais intermediários desta reação, enquanto os produtos majoritários são biomassa e dióxido de carbono. Favorecendo a continuidade da biodegradação, como visto na Figura 10 (BERTHECORTI; HÖPNER, 2005).

Figura 10: Degradação aeróbica dos hidrocarbonetos aromáticos.

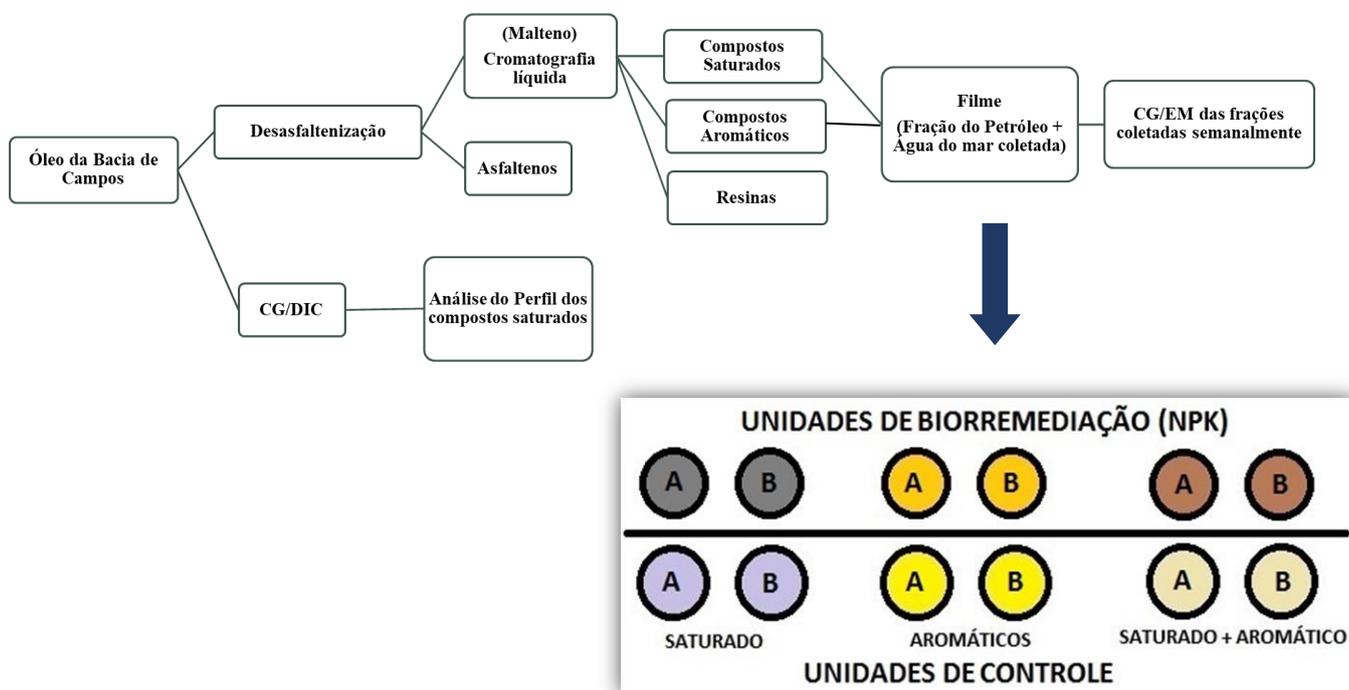


Fonte: Figura adaptada (FRITSCHÉ; HOFRICHTER, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODO

A metodologia seguida, para o desenvolvimento da pesquisa, foi a experimental aplicada e, para isso, foi utilizado uma amostra de óleo da Bacia de Campos, RJ, a água do mar da Praia dos Cavaleiros, Macaé, RJ, os microrganismos *in loco* e o fertilizante NPK (10:10:10) como estimulador da biorremediação. O fluxograma abaixo, Figura 11, apresenta, detalhadamente, a metodologia experimental empregada e os materiais utilizados para a realização desta pesquisa.

Figura 11: Fluxograma do experimento.



3.1. Caracterização da água e do óleo utilizados no experimento

3.1.1. Coleta da Água do Mar

A água do mar utilizada, durante a simulação, foi a da Praia de Cavaleiros, em Macaé, na Região do Norte Fluminense do Rio de Janeiro. Foi coletado um volume aproximado de 1000mL a temperatura ambiente, 25°C. O volume de água foi armazenado em um recipiente de plástico estéril e enviado para o laboratório.

3.1.2. Propriedades Físicas do Óleo da Bacia de Campos

Foi utilizado um óleo produzido na Bacia de Campos para o desenvolvimento deste trabalho. O óleo foi cedido pelo Laboratório de Geoquímica do Laboratório de Exploração e Produção de Petróleo - LENEP / UENF. As propriedades físicas do óleo são: °API = 26,9; Densidade= 0,8892g/L e Viscosidade dinâmica = 54,2cp.

3.2. Preparação das Amostras de petróleo

Para a preparação das amostras, o óleo utilizado foi submetido a um processo de desasfaltenização. A um béquer de 250mL foi transferida uma massa de 4,997g de óleo e adicionado um volume de 80mL do solvente apolar n-Hexano. A mistura foi então recoberta com papel alumínio, evitando a evaporação tanto do solvente quanto das frações mais leves do óleo. A amostra foi colocada em repouso por um período de 24 horas.

Após o intervalo estipulado, notou-se a separação por segregação gravitacional tanto do malteno (nome dado a mistura que compreende as frações saturado, aromático e resina do petróleo) quanto do asfaleno. O asfaleno precipitou no fundo do béquer e o malteno permaneceu solubilizado no solvente. Logo em seguida, passou-se a mistura em um filtro, com o objetivo de reter o asfaleno. Foi realizado o mesmo procedimento por 3 vezes consecutivas utilizando-se um volume total de 240mL do solvente n-Hexano.

Após a filtração e evaporação do solvente, pesou-se tanto a massa de malteno quanto a de asfalenos. A massa de malteno totalizou 4,0154g e a massa de asfaleno foi de 0,2016g, totalizando 4,2170g. Nota-se que o somatório das massas resultantes não totaliza a massa utilizada inicialmente no experimento, 4,997g. Nota-se que o somatório das massas resultantes não corresponde a massa total de óleo utilizada, inicialmente, no experimento, pois, ocorreu perda de massa ao longo do processo, possivelmente, por evaporação das frações mais leves de petróleo e também durante a etapa de filtração.

Como dito anteriormente, o malteno é formado pela mistura dos compostos saturados, aromáticos e resinas. Por este motivo, para que fossem montadas as 12 unidades de simulação foi necessário realizar a separação desses compostos. Para tal, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida em coluna. A separação está diretamente relacionada com o comportamento do composto, que percorre a coluna, em relação a fase móvel e a fase estacionária. A interação dos componentes da mistura com estas duas fases é influenciada por diferentes forças intermoleculares.

3.3. Separação dos Componentes do Malteno por Cromatografia Líquida

A fração de malteno extraída pelo processo de desasfaltenização foi submetida ao processo de fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel, para a obtenção de três frações distintas: F1 (hidrocarbonetos saturados), F2 (hidrocarbonetos aromáticos) e F3 (resinas). No trabalho, só foram utilizadas as frações de saturados e aromáticos.

A separação por cromatografia líquida foi realizada utilizando-se sílica gel 60 (230 - 400 mesh; Merck), previamente ativada em estufa a 70-80°C durante 24 horas. Os eluentes utilizados foram n-hexano para obtenção dos hidrocarbonetos saturados (60mL), o diclorometano (40mL) para os hidrocarbonetos aromáticos e a mistura diclorometano: metanol (40mL) para as resinas.

As frações permaneceram nos béqueres, para evaporação dos solventes, em capela de exaustão à temperatura ambiente, e então foram pesadas. Em seguida, foram armazenadas em vidros âmbar, devidamente identificados, para posterior análise por cromatografia em fase gasosa.

3.4. Fator Estimulante da Biorremediação

Tendo como base a referência bibliográfica (AL-HADHRARN et al., 1997, MERLIN et al., 1994, SVEUM et al., 1991), foi utilizado o fertilizante NPK, pulverizado, ao longo de todo o experimento, que é composto por uma mistura de três nutrientes principais (Nitrogênio, Fósforo e Potássio), também chamados de macronutrientes, na composição de um fertilizante. Em sua composição química contém fosfato de amônia $[(\text{NH}_4)^3\text{PO}_4]$, sulfato de amônia $[(\text{NH}_4)_3\text{SO}_4]$ e cloreto de potássio [KCl], onde as proporções dos compostos (N : P : K) são de 10 : 10 : 10.

Souza (2003) concluiu que a biorremediação associada à bioestimulação com NPK, na proporção de 10% p/v, ou seja, massa do soluto NPK e volume de óleo derramado, favorece a remoção de, aproximadamente, 30% dos alcanos; enquanto que o principal mecanismo de atenuação, a evaporação, foi capaz de remover, aproximadamente, 60% dos n-alcanos menores que n-C16 nos quatro primeiros dias da simulação, chegando a 80% após um mês.

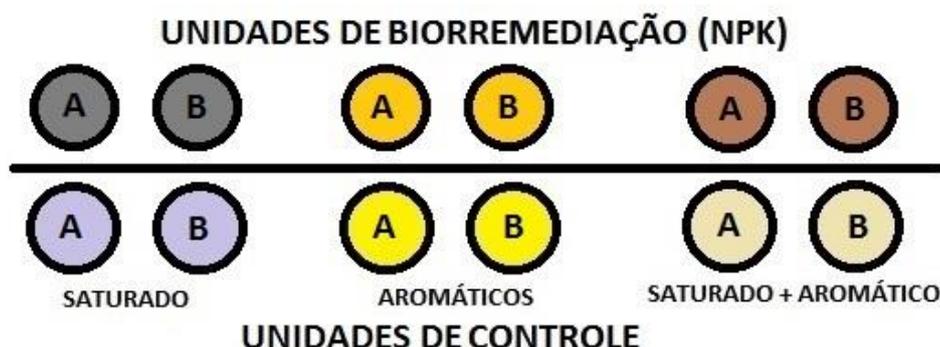
3.5. Estruturação das Unidades de Simulação

A simulação foi realizada no laboratório de Geoquímica no Laboratório de Exploração e Produção de Petróleo (LENEP), em Macaé/RJ. Para obter um resultado mais satisfatório da simulação, foi medida a temperatura no ambiente onde os experimentos foram conduzidos. A temperatura não apresentou variações bruscas, apresentando um valor médio de 27°C.

Para serem montadas as unidades da simulação de um derrame das frações de óleo, foram utilizados 12 recipientes de vidro, com diâmetro de 100mm e profundidade 15mm, onde foram preparados filmes das frações de saturado, aromático e da mistura saturado + aromático. Esses filmes foram feitos dissolvendo-se as frações com os solventes n-hexano e diclorometano. As soluções de compostos saturado + n-hexano e de aromáticos + diclorometano foram distribuídas uniformemente entre as unidades de Controle e de Biorremediação, Figura 12. Os solventes foram evaporados à

temperatura ambiente e as frações formaram um filme no fundo dos recipientes de vidro. Em seguida, foi adicionado um volume de 80mL de água do mar em cada recipiente. Em seis dessas unidades foi adicionado o fertilizante, a 10% do volume da fração utilizada, com o objetivo de se avaliar a sua influência sobre a degradação das frações de petróleo pelos microrganismos, chamadas unidades de Biorremediação, e as outras seis placas foram denominadas unidades de Controle. Os experimentos foram conduzidos em duplicatas (A e B), como representado na Figura 12.

Figura 12: Unidades de simulação da Biorremediação da Fração de Saturados, Aromáticos e Saturados + Aromáticos, com a utilização do Fertilizante NPK, e as unidades de Controle, sem adição do fertilizante.



Ao longo da simulação da biorremediação os recipientes foram agitados 2 vezes ao dia com o objetivo de oxigenar a água do mar. Para incrementar ainda mais a concentração de oxigênio utilizou-se um aerador de aquário. A aeração manual foi realizada por um período aproximado de 2 minutos em cada placa.

3.6. Coleta das amostras das frações de saturado e aromático das unidades de Biorremediação e de Controle

Semanalmente foi coletada uma alíquota da fração de saturado, aromático e da mistura saturado + aromático da porção flutuante presente no recipiente de vidro. Para realizar essa coleta foi utilizado uma espátula de aço inoxidável.

A espátula com a fração coletada foi lavada com o solvente diclorometano dentro de um becker. Após os solventes serem evaporados, as frações foram transferidas para frascos com a finalidade de serem pesadas para posterior injeção e análise por cromatografia em fase gasosa.

3.7. Análise Cromatográfica

3.7.1. Análise dos Compostos do Óleo original utilizado na simulação

Antes de analisar as amostras das frações provenientes das unidades de Controle e de Biorremediação, o óleo foi analisado num cromatógrafo a gás FID Agilent 6890N com uma coluna de coluna de sílica fundida HP-5 (espessura de película de 30m x 0,32mm x 0,25µm). O injetor e o detector foram mantidos a 280°C e 340°C, respectivamente, e o programa de temperatura da coluna foi 40°C seguido por aquecimento a 320°C a 2,5°C/min (retenção isotérmica durante 18 min). O gás de arraste utilizado foi Hélio, este foi utilizado para avaliar a presença de n-alcanos e de isoprenóides (pristano e fitano) no óleo. O cromatograma obtido está representado na Figura 13, da seção resultados e discussão deste artigo.

3.7.2. Análise dos Compostos Saturados e Aromáticos presentes nas amostras das unidades de Biorremediação e Controle

As amostras das frações de compostos saturados e aromáticos contidas nas unidades de Controle e Biorremediação, após 7 dias e 21 dias de experimento, foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), realizadas em um cromatógrafo em fase gasosa Agilent 6890N, acoplado a um analisador seletivo de massas Agilent 5973-MSD, com o espectrômetro de massas operando com uma energia de ionização de 70eV. O hélio foi usado como gás de arraste. As amostras foram injetadas no modo sem divisão de fluxo, em uma coluna capilar de sílica fundida D-B5 MS (30m x 0,25mm x 0,25mm de espessura do filme). A temperatura inicial, para o forno, foi mantida a 60°C por dois minutos, e foi programada uma taxa de aquecimento de 22°C/min até 200°C, sendo mantida a esta temperatura por 3 minutos. Uma nova rampa de aquecimento foi estabelecida, partindo de 200°C, com taxa de aquecimento de 3°C/min, chegando até 320°C, permanecendo nesta temperatura por mais 25 minutos. A temperatura do injetor do cromatógrafo e da linha de transferência foi de 280°C.

Utilizou-se o método de monitoramento seletivo de íons para avaliar as seguintes classes de compostos: n-alcanos e fitano (m/z 85), hopanos (m/z 191) e metil fenantrenos (m/z 192). Os resultados qualitativos gerados foram processados pelo sistema operacional Agilent Chemstation. As abundâncias relativas de cada íon, individualmente, foram obtidas através da integração das áreas dos picos registrados no cromatograma de massa.

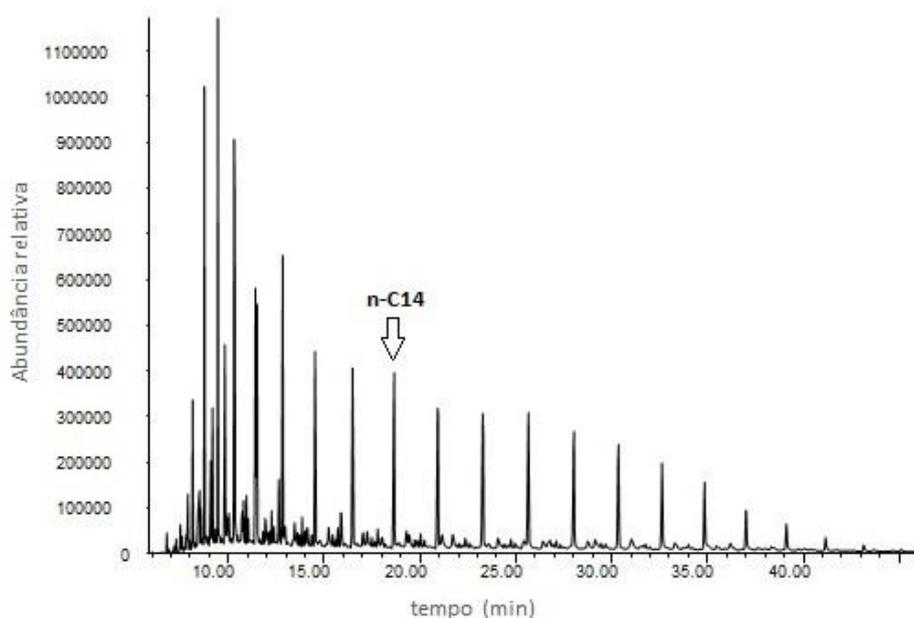
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da caracterização do óleo da Bacia de Campos serão apresentados com o objetivo de avaliar a qualidade do óleo e o potencial de biodegradação dos microrganismos presentes, naturalmente, na água do mar da Praia dos Cavaleiros, Macaé, RJ, sobre as frações de compostos saturados e aromáticos, isoladamente, e em conjunto.

4.1. Caracterização do Óleo utilizado no Derrame Simulado

A distribuição dos n-alcenos é um dos parâmetros mais empregados na caracterização do óleo. A chamada “impressão digital” difere de óleo para óleo e, portanto, é bastante empregada no reconhecimento da origem de um óleo derramado *in natura*. A partir desta análise foi possível obter um perfil cromatográfico da distribuição dos compostos saturados do petróleo usado no experimento, Figura 13.

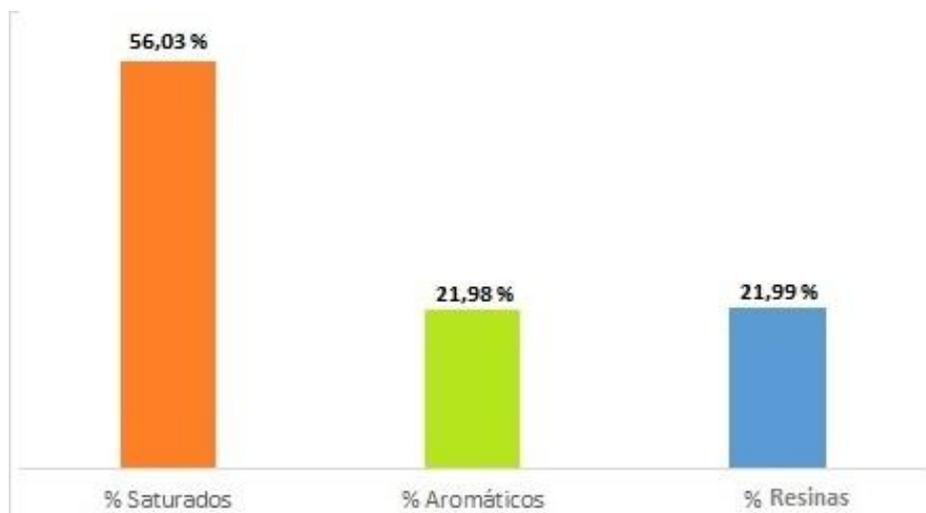
Figura 13: Cromatograma do óleo original proveniente da Bacia de Campos



Ao analisar o perfil cromatográfico da Figura 20, pode-se concluir que a amostra de óleo usada no experimento de simulação de derrame apresenta uma elevada abundância das n-parafinas, portanto, trata-se de um óleo parafínico. Não apresentando, índices consideráveis de biodegração, uma vez que os compostos saturados são os primeiros a serem afetados por esse processo, por serem menos resistentes (WANG; STOUT, 2007; WANG et al., 2005).

Após o fracionamento do óleo, por cromatografia líquida, para obtenção das frações de saturado e de compostos aromáticos usadas no experimento, foi possível determinar a porcentagem dos hidrocarbonetos saturados, aromáticos e resinas, como ilustrado na Figura 14.

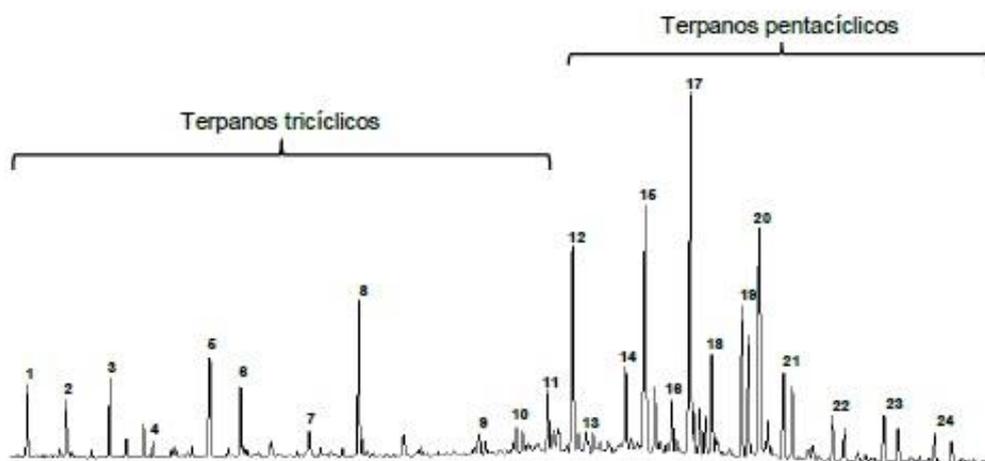
Figura 14: Resultado da análise do óleo da Bacia de Campos por cromatografia líquida.



A partir dos resultados obtidos pelo método de fracionamento foi observado que o óleo escolhido forneceu o dobro da quantidade de compostos saturados quando comparado à de compostos aromáticos e de resinas, ratificando a afirmação supracitada de tratar-se de um óleo parafínico.

Na análise dos componentes dos biomarcadores da família dos Terpanos, das amostras das frações de saturado das unidades de Biorremediação e de Controle utilizadas, foi possível confirmar a presença de: terpanos tricíclicos e terpanos pentacíclicos, conforme ilustra a Figura 15 e Tabela 3.

Figura 15: Cromatograma mostrando a distribuição dos terpanos tricíclicos e pentacíclicos no óleo da Bacia de Campos usados para a obtenção das frações de compostos saturados e aromáticos.



Os compostos policíclicos saturados são identificados na Tabela 3:

Tabela 3: Compostos da família dos Terpanos correlacionando o número do pico, o nome do composto e sua fórmula molecular

| Pico | Nome do Composto | Fórmula Molecular |
|------|--|---|
| 1 | Terpano Tricíclico C19 | C ₁₉ H ₃₄ |
| 2 | Terpano Tricíclico C20 | C ₂₀ H ₃₆ |
| 3 | Terpano Tricíclico C21 | C ₂₁ H ₃₈ |
| 4 | Terpano Tricíclico C22 | C ₂₂ H ₄₀ |
| 5 | Terpano Tricíclico C23 | C ₂₃ H ₄₂ |
| 6 | Terpano Tricíclico C24 | C ₂₄ H ₄₄ |
| 7 | Terpano Tricíclico C25 (S + R) | C ₂₅ H ₄₆ |
| 8 | Terpano Tetracíclico C24; Terpano Tricíclico C26 | C ₂₄ H ₄₂ ; C ₂₆ H ₄₈ ; |
| 9 | Terpano Tricíclico C28 (S + R) | C ₂₈ H ₅₂ |
| 10 | Terpano Tricíclico C29 (S + R) | C ₂₉ H ₅₄ |
| 11 | 18 α (H) - 22,29,30 - Trisnormehopano (Ts) | C ₂₇ H ₄₆ |
| 12 | 17 α (H) - 22,29,30 - Trisnorhopano (Tm) | C ₂₇ H ₄₆ |
| 13 | Terpano Tricíclico C30 (S + R) | C ₃₀ H ₅₆ |
| 14 | 17 α (H), 21 β (H)-25-norhopano | C ₂₉ H ₅₀ |
| 15 | 17 α (H), 21 β (H)-30-norhopano (C29) | C ₂₉ H ₅₀ |
| 16 | 17 β (H), 21 α (H)-normoretano | C ₂₉ H ₅₀ |
| 17 | 17 α (H), 21 β (H)-hopano (C30) | C ₃₀ H ₅₂ |
| 18 | 17 β (H), 21 α (H)-moretano | C ₃₀ H ₅₂ |
| 19 | 17 α (H), 21 β (H)-homohopano (22S +22 R) | C ₃₁ H ₅₄ |
| 20 | Gamacerano | C ₃₀ H ₅₂ |
| 21 | 17 α (H), 21 β (H)-bishomohopano (22S +22 R) | C ₃₂ H ₅₆ |
| 22 | 17 α (H), 21 β (H)-trishomohopano (22S +22 R) | C ₃₃ H ₅₈ |
| 23 | 17 α (H), 21 β (H)-tetrahomohopano (22S +22 R) | C ₃₄ H ₆₀ |
| 24 | 17 α (H), 21 β (H)-pentaahomohopano (22S +22 R) | C ₃₅ H ₆₂ |

A partir da análise do perfil cromatográfico, pode-se concluir que a distribuição dos terpanos é dominada pelos pentacíclicos, com elevada abundância do hopano (C30). Tanto os Terpanos tricíclicos como os pentacíclicos são característicos de todos os tipos de petróleo, além de serem compostos bastante resistentes à biodegradação (WENGER et al, 2001).

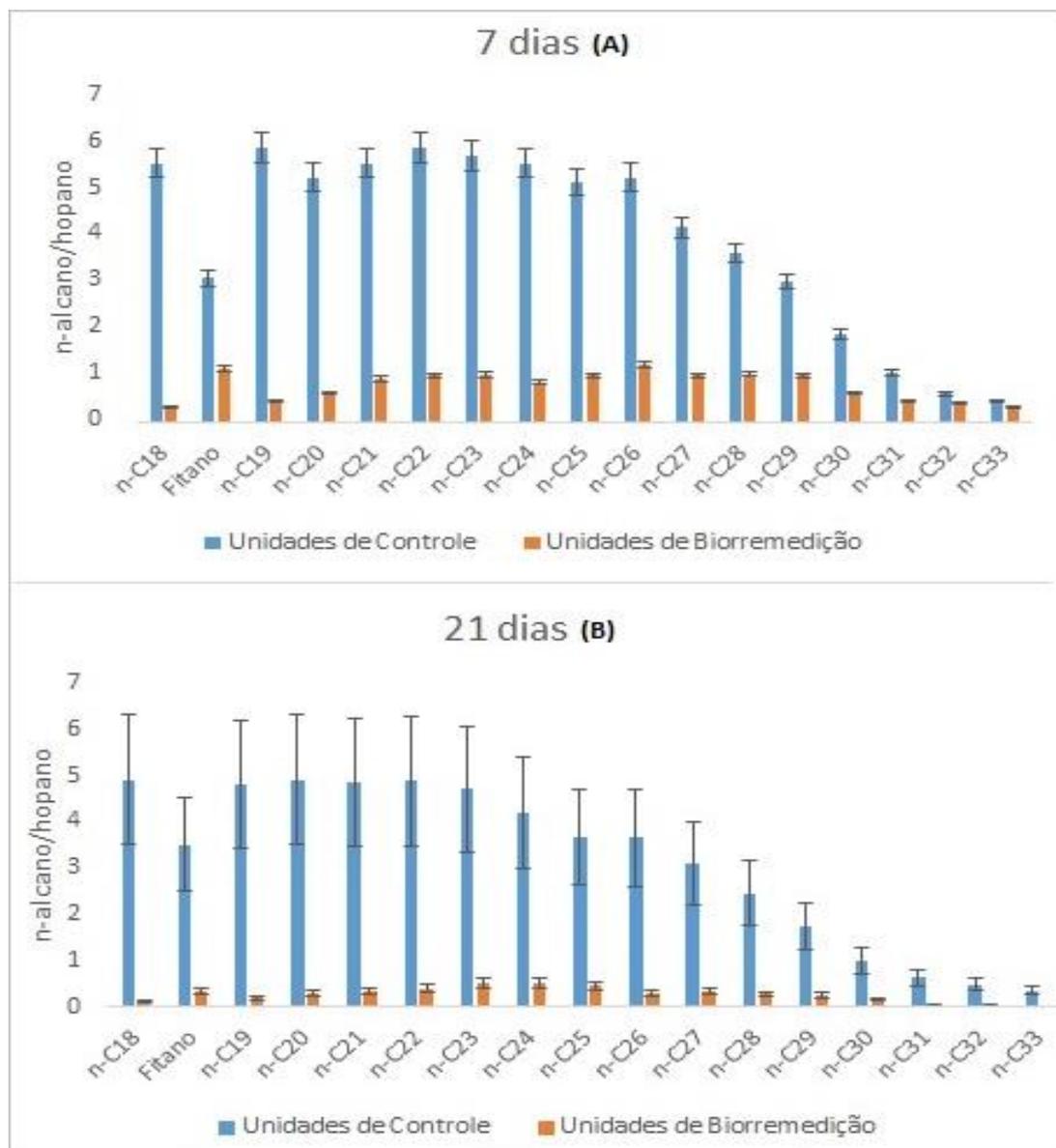
4.2. Avaliação da Biodegradação de n-Alcanos e Fitano

Para realizar uma avaliação do nível da biodegradação de n-alcanos e do fitano as amostras de hidrocarbonetos saturados foram analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massas (CG-EM).

4.2.1. n-Alcanos

Foram analisadas as amostras provenientes das unidades de Biorremediação e de Controle contendo as frações de compostos saturados e da mistura saturado + aromáticos, nos 7 e 21 dias do experimento. Os resultados foram expressos na forma de razões entre as abundâncias relativas dos n-alcanos de n-C18 a n-C33 e fitano em relação ao Hopano e podem ser vistos na Figura 16.

Figura 16: Comparação entre os valores médios das razões de n-alcano/Hopano e de Fitano/Hopano das amostras de saturados coletadas das unidades de Biorremediação e Controle, contendo apenas a fração de hidrocarbonetos saturados, após 7 dias (A) e 21 dias (B) do início da simulação.



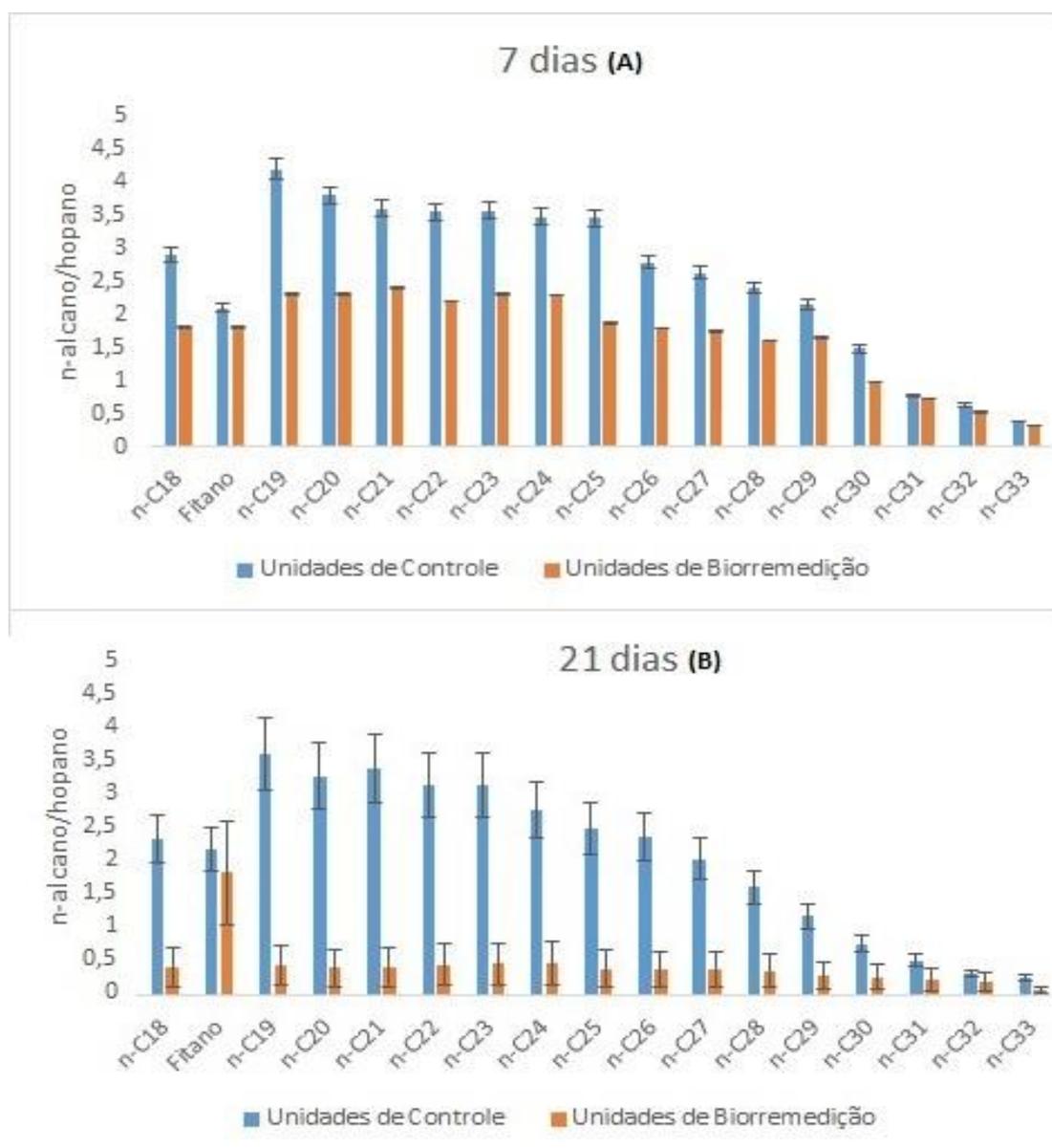
Nas unidades de Biorremediação, com a aplicação do fertilizante, observou-se que houve uma redução da razão do Fitano/Hopano e uma redução na razão n-C33/Hopano, ao final de 7 dias, Figura 16A, como consequência do processo de biodegradação. Logo, a presença e o teor de nutrientes inorgânicos exerceram influência positiva sobre a atividade dos microrganismos.

Observou-se que nas unidades de controle, para ambos os tempos de experimentos, a quantidade de alcanos se manteve praticamente constante. Entretanto, nas unidades de Biorremediação, com a aplicação do fertilizante, observou-se que com 21 dias de simulação, Figura

16B, houve uma redução da razão do Fitano/Hopano de 0,75 para 0,35 (53%) e uma redução ainda mais acentuada de 0,2 a 0,01 (95%) na razão n-C33/Hopano, ao final de 21 dias, como consequência do processo de biodegradação. Logo, a presença e o teor de nutrientes inorgânicos exerceram influência positiva sobre a atividade dos microrganismos.

A seguir são apresentados os resultados da avaliação da influência da fração de aromáticos sobre a biodegradação dos n-alcenos de n-C18 a n-C33 e sobre o isoprenóide Fitano ao longo dos 7 e 21 dias, Figura 17.

Figura 17: Comparação entre os valores médios das razões de n-alceno/Hopano e de Fitano/Hopano das amostras de saturados + Aromáticos coletadas das unidades de Biorremediação e Controle do experimento, após 7 dias (A) e 21 dias (B) do início da simulação.

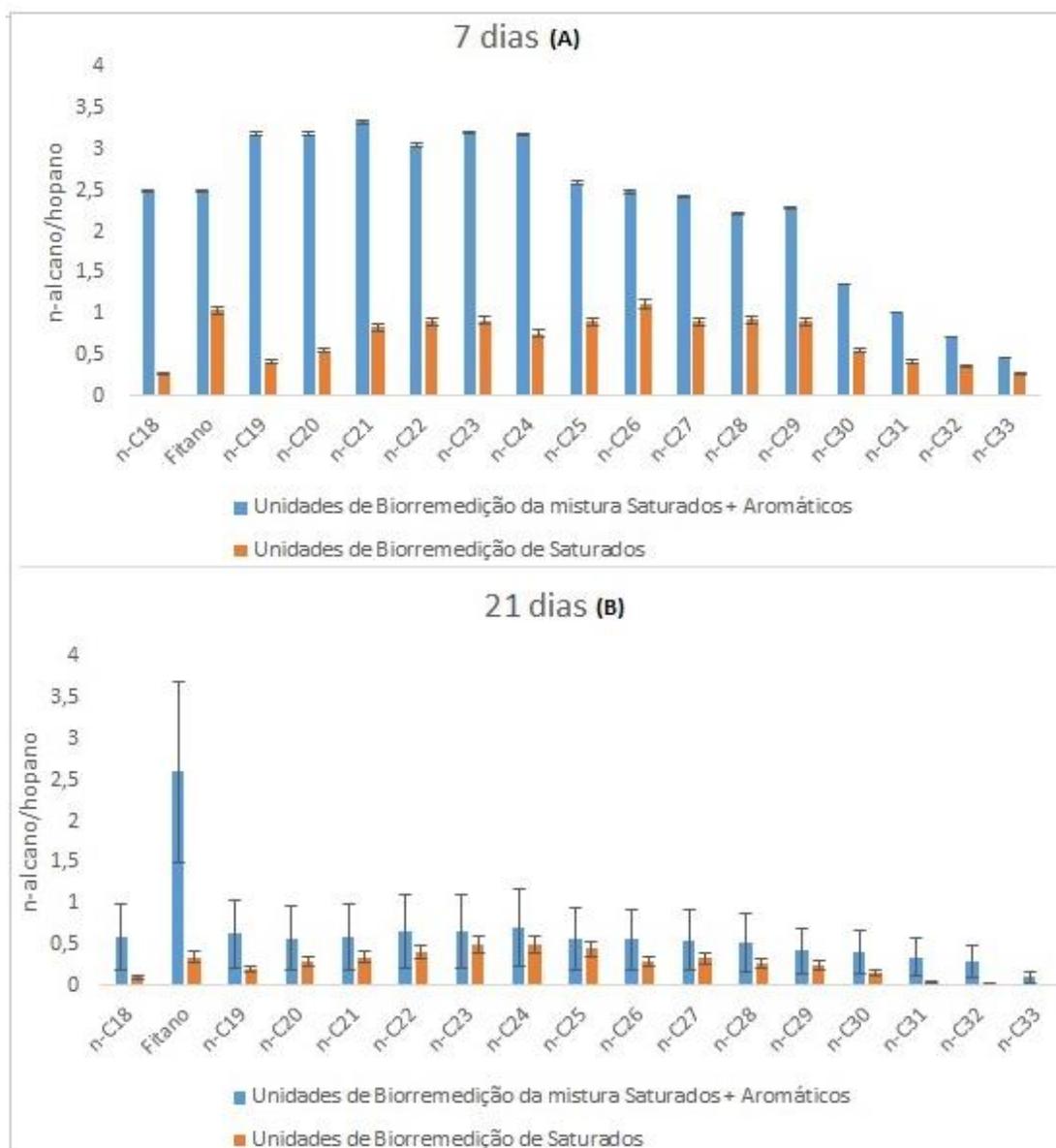


Ao longo dos 7 dias de experimento, pode ser observado a biodegradação dos compostos saturados de n-C18 a n-C33, nas unidades de Biorremediação, na presença dos compostos aromáticos quando comparado com os resultados das unidades de Controle. Porém, é possível notar que os compostos aromáticos dificultam a degradação dos compostos saturados devido à sua complexidade, toxicidade, dificultando o acesso direto dos microrganismos aos compostos saturado, conforme ilustrado na Figura 17A. A resistência da mistura de hidrocarbonetos à biodegradação depende das características do óleo, da quantidade de óleo, da natureza da comunidade microbiana e de uma variedade de fatores no ambiente que influenciam a atividade microbiológica (COOKSON, 1995).

Aos 21 dias de experimento, Figura 17B, pode ser observado que a biodegradação dos compostos saturados de n-C18 a n-C33, nas unidades de Biorremediação, foi eficiente mesmo na presença dos compostos aromáticos quando comparado com os resultados das unidades de Controle. Há um leve decréscimo, por exemplo da razão n-C31/Hopano que variou de 0,68 a 0,63 representando uma redução de 7% na abundância dos compostos das frações analisadas nas unidades de controle, provavelmente, isso se deve a volatilidade dos compostos, uma vez que, o principal processo intempérico que atua sobre os n-alcanos, em um curto período de tempo, logo após o derrame, é a evaporação.

Na Figura 18 é avaliada, de forma mais eficiente, a influência dos compostos aromáticos sobre a biodegradação dos compostos saturados.

Figura 18: Comparação entre os valores médios das razões de n-alcenos/Hopanos e Fitano/Hopano da análise das amostras das unidades de Biorremediação para as frações de saturado e saturado + aromático. Para 7 dias (A) e 21 dias (B) do início do experimento.



A presença dos compostos aromáticos influenciou negativamente a ação degradadora dos microrganismos sobre a fração de saturados, principalmente durante os 7 dias do experimento, provavelmente, devido a elevada toxicidade destes compostos sobre os microrganismos naturalmente presentes na água do mar, conforme observado nos resultados expressos na Figura 18A. De acordo com Jonhsen e colaboradores (2004), os compostos aromáticos não são degradados pela maioria dos

microrganismos, devido a estabilidade, em virtude da ressonância dos anéis aromáticos, a complexa estrutura química e a baixa solubilidade em água, contribuindo assim para a contaminação do meio.

Na análise dos resultados após os 21 dias de experimento observou-se na Figura 18B que o Fitano foi o composto que menos sofreu a biodegradação se comparado aos outros n-alcenos, como esperado. Uma vez que dentro da fração de compostos saturados, os alcenos normais são os mais facilmente biodegradados enquanto os isoprenóides como pristano e Fitano são mais resistentes à biodegradação. Portanto pristano e Fitano, podem servir como parâmetros para avaliar a extensão da biodegradação do petróleo em tratamentos de biorremediação do mar.

5. CONCLUSÃO

Observou-se que com 21 dias da simulação houve uma redução da razão do Fitano/Hopano de 0,75 para 0,35 (53%) e uma redução ainda mais acentuada de 0,2 a 0,01 (95%) na razão n-C33/Hopano, ao final de 21 dias, nas amostras contendo apenas compostos saturados.

A biodegradação dos compostos saturados de n-C18 a n-C33, nas unidades de Biorremediação, foi eficiente mesmo na presença dos compostos aromáticos quando comparado com os resultados das unidades de Controle, mas reduzida. Provavelmente, porque os compostos aromáticos apresentaram elevada toxicidade, influenciando diretamente na eficiência dos microrganismos em degradar as frações de compostos saturados.

O Fitano foi o composto que menos sofreu a biodegradação se comparado aos outros n-alcenos, pois, estes são os mais facilmente biodegradados enquanto os isoprenóides como pristano e Fitano são mais resistentes à biodegradação, uma característica marcante dos biomarcadores.

A utilização do fertilizante, NPK (10:10:10), contribuiu, significativamente, para a biodegradação das frações de saturados, principalmente os n-alcenos, pelos microrganismos, ao longo dos 21 dias de experimento.

A partir do estudo, pode-se concluir que em condições adequadas de temperatura e pressão o petróleo é, muitas vezes, biodegradado, tendo suas propriedades físico-químicas alteradas, transformando-o em um "óleo pesado" (menor °API), diminuindo seu valor econômico.

Leis ambientais, normas e outras foram criadas com o intuito de responsabilizar o culpado, seja pessoa física ou jurídica, em contaminar e/ou degradar o meio ambiente. Acidentes ambientais impactam direta e indiretamente todos os seres que dependem do ambiente para sobreviver. Mas, por

outro lado, vale a tentativa de fazer sensibilizar as Companhias no intuito de uma exploração mais ambientalmente consciente, ou seja, utilizar os recursos sem causar danos, conceito de sustentabilidade. Desta forma, será possível fazer com que os recursos sejam aproveitados por gerações vindouras.

Com os resultados, foi possível concluir que a biorremediação é uma técnica eficaz, conforme verificado em laboratório, e ambientalmente sustentável e, portanto, não gera impactos ao meio ambiente. Porém, é uma alternativa de remediação e não de prevenção. Assim, é primordial fortalecer os mecanismos de controle e fiscalização para evitar que derrames de óleos ocorram.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Hadhrami M. N., Lappin-Scott H. M., Fisher. Studies on the biodegradation of three groups of n- alkanes in the presence of molasses and mineral fertilizer by *Pseudomonas aeruginosa*, *Marine Pollution Bulletin*. n. 34 p.969-974, 1997.
- ALRUMMAN, A. S. B. D.; PATON, S. G. I. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University – Science*. v. 27, n. 1, p. 31-41, 2015.
- ATLAS, R. M., HAZEN, T. C. Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environmental Science and Technology*. 2011.
- BAEDECKER, M. J. et al. Loss of volatile hydrocarbons from an LNAPL oil source. *Journal of Contaminant Hydrology*. v. 126, n. 3–4, p. 140-152, 2011.
- BALKE, N. S.; Brown, S. P. Oil supply shocks and the US economy: An estimated DSGE model. *Energy Policy*. v. 116, p. 357-372, 2018.
- BANERJEE, A.; GHOSHAL, A. K. Bioremediation of petroleum wastewater by hyper-phenol tolerant *Bacillus cereus*: preliminary studies with laboratory-scale batch process. *Bioengineered*. v. 8, v. 5, p. 446-450, 2017.
- BERTHE-CORTI, L; HÖPNER, T. *Geo-Biological Aspects of Coastal Oil Pollution*. Institute for Chemistry and Biology of the Marine Environment (ICBM). 2005
- BORAH, D.; YADAV, R.N.S. Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. *Egyptian Journal of Petroleum*. v. 26, n. 1, p.181-188, 2017.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – Conama. Resolução 001/1986. Brasília, 1986.
- BRAGATO, M. *Tratamento in-situ de solo contaminado por derivado de petróleo e metais*. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 2006.
- CORDES, E. E.; JONES, D. O. B.; SCHLACHER, T. A.; AMON, D. J.; BERNARDINO, A.F. et al. Environmental Impacts of the Deep-Water Oil and Gas Industry: A Review to Guide Management Strategies. *Frontiers in Environmental Science*. v. 4, p.58, 2016.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnol Res Int*. 2010.

SOUZA, E. S. *Desenvolvimento de métodos de biorremediação aplicados a derrames de petróleo em água do mar – Testes laboratoriais*. Tese (Doutorado em Engenharia de Reservatório e Exploração de Petróleo) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé. f. 294, 2003.

ETCHEPARE, M.; RADDATZ, G. C.; DE MORAES FLORES, É. M.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; BARIN, J. S.; DE MENEZES, C. R. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT-Food Science and Technology*. v.65, p.511-517, 2016.

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*. v. 205, n. 3, p. 223-240, 2004.

FINOTTI, A. R. et al. Avaliação da influência do etanol sobre o grau de volatilização BTEX em solos impactados por derrames de gasolina/etanol. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. v. 14, n. 4 p. 443-448, 2009.

FRITSCHÉ, W.; HOFRICHTER, M. *Aerobic degradation by microorganisms*. Wiley Online Library. p.144–167, 2008.

FRITSCHÉ, W.; HOFRICHTER, M. *Em Biotechnology*; Klein, J., ed.; John Wiley & Sons: New York, 2000.

HASSAN, H A.; ALY, A A. Isolation and characterization of three novel catechol 2,3- dioxygenase from three novel haloalkaliphilic BTEX-degrading *Pseudomonas* strains. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 106, p.1107- 1114, 2018.

HUR, M.; WARE, R. L.; PARK, J.; MCKENNA, A. M.; RODGERS, R. P.; NIKOLAU, B. J.; MARSHALL, A. G. Statistically Significant Differences in Composition of Petroleum Crude Oils Revealed by Volcano Plots Generated from Ultrahigh Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectra. *Energy & Fuels*. 2018.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*. v.37, p.1192-1201, 2007.

KHALIFA, A. Y. Z. Degradation of diesel-oil by a newly isolated *Kocuria sediminis* DDK6. *African Journal of Microbiology Research*. v. 11, n. 10, p. 400-407, 2017.

LAHEL, A.; FANTA, A. B.; SERGIENKO, N.; SHAKYA, M.; LÓPEZ, M. E.; BEHERA, S. K.; RENE, E. R.; PARK, H. S. Effect of process parameters on the bioremediation of diesel contaminated soil by mixed microbial consortia. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v.113, p.375-385, 2016.

MARTINS, B. A. D. *Avaliação da cinética de biorremediação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes Nitrogênio e Fosforo*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC, Florianópolis, 2004.

MAPELLI, F.; SCOMA, A.; MICHOU, G.; AULENTA, F.; BOON, N. Biotechnologies for Marine Oil Spill Cleanup: Indissoluble Ties with Microorganisms. *Trends in Biotechnology*. v. 35, n. 9, p.860-870, 2017.

MEGHARAJ, M. et al. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environment International*. v. 37, n. 8, p. 1362-1375, 2011.

MERLIN F. X.; LEE K.; SWANNEL R.; OUTDOT J.; BASSERES A.; RELLY T.; CHAUERY C.; DALMAZZONE C.; SVEUM P. Protocol for experimental assessment of bioremediation agents on a petroleum polluted shoreline. *Proceeding of the 17th Arctic and Marine Oilspill Program (AMOP) Technical Seminar*. n. 1, p. 465-478, 1994.

MEYER, D. D.; BEKER, S. A.; BÜCKER, F.; PERALBA, M. C. R.; FRAZZON, A. P. G.; OSTI, J. F.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v.95, p. 356-363, 2014.

NANCA, C. L.; NERI, K. D.; NGO, A. C. R.; BENNETT, R. M.; DEDELES, G. R. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Moderately Halophilic Bacteria from Luzon Salt Beds. *Journal of Health and Pollution*. v. 8, n. 19, p.180915-10, 2018.

O'BRIEN, P. L.; DESUTTER, T. M.; CASEY, F. X.; KHAN, E.; WICK, A. F. Thermal remediation alters soil properties—a review. *Journal of Environmental Management*. v. 206, p. 826-835, 2018.

OYEHAN, TAJUDEEN A.; AL-THUKAIR, A. A. Isolation and characterization of PAH- degrading bacteria from the Eastern Province, Saudi Arabia. *Marine Pollution Bulletin*. v. 115, n. 1-2, p.39-46, 2017.

PATEL, S.; HOMAEI, A.; PATIL, A.; DAVEREY, A. Microbial biosurfactants for oil spill remediation: pitfalls and potentials. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 103, n. 1, p.27-37, 2018.

PATHAK, C.; MANDALIA, H. C. Petroleum industries: environmental pollution effects, management and treatment methods. *International Journal of Separation for Environmental Sciences*. v. 1, n. 1, p. 55, 2012.

PETERS, K.; WALTERS, C.; MOLDOWAN, J. *The biomarker guide: volume 2, biomarkers and isotopes in petroleum systems and earth history*. Cambridge University Press, 2007.

PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M. *The biomarker guide: biomarkers and isotopes in the environment and human history*. Cambridge University Press, 2005.

POHREN, R. S.; ROCHA, J. A. V.; HORN, K. A.; VARGAS, V. M. F. Bioremediation of soils contaminated by PAHs: Mutagenicity as a tool to validate environmental quality. *Chemosphere*. v. 214, p.659-668, 2019.

POULSEN, K. G.; KRISTENSEN, M.; TOMASI, G.; CRUZ, M. D.; CHRISTENSEN, J. H. The Pixel-Based Chemometric Approach for Oil Spill Identification and Hydrocarbon Source Differentiation: Two Case Studies from the Persian Gulf. *Oil Spill Environmental Forensics Case Studies*. p. 443-463, 2018.

PUGAS, M. S. *Efeitos secundários resultantes da aplicação de métodos oxidativos para degradação de contaminantes orgânicos em solos*. Tese (Doutorado em Recursos Minerais e Hidrogeologia)- Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2015.

RODRIGUES, G. M. A. *Atividade de armazenamento e distribuição de combustível nos centros urbanos: os postos de combustíveis e a saúde pública*. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo- USP, São Paulo, 2015.

SVEURN P.; FAKSNCCSS L.G.; RAMSTAD S. Bioremediation of oil-contaminated shorelines: the role of carbon in fertilizers. *Hydrocarbon Biorremediation*. v. 1, n. 2, p. 163- 174, 1991.

SPEIGHT, J. G. *The Chemistry and Technology of Petroleum*. 5. ed. Boca Raton: Crc Press Taylor & Francis Group, 2014.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 120, p.71-83, 2017.

WALKER, A. H. Oil Spills and Risk Perceptions. In: FINGAS, M. *Oil Spill Science and Technology*. 2^a. ed. Edmonton: Elsevier, p. 1-70, 2017.

WANG, Z., YANG, C., FINGAS, M., HOLLEBONE, B., PENG, X., HANSEN, A. B., CHRISTENSEN, J. H. Characterization, weathering, and application of sesquiterpanes to source identification of spilled lighter petroleum products. *Environmental science & technology*, ACS Publications, v.39, n.22, p.8700–8707, 2005.

WANG, Z., STOUT, S. A. *Oil Spill Environmental Forensics: Fingerprinting and Source Identification*. [S.l.]: Academic Press, 2007.

WEELINK, S. A. B.; VAN EEKERT, M. H. A.; STAMS, A. J. M. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. v.9, p.359-385, 2010.

YANG, C.; BROWN, C. E.; HOLLEBONE; YANG, Z.; LAMBERT, P.; FIELDHOUSE, B.; LANDRIAULT, M.; WAN, Z. Chemical fingerprints of crude oils and petroleum products. In: FINGAS, M. *Oil Spill Science and Technology*. p.209-304, 2017.

ZABBEY, N. et al. Remediation of contaminated lands in the Niger Delta, Nigeria: prospects and challenges. *Science of The Total Environment*. v. 586, n. 90, p. 952-965, 2017.