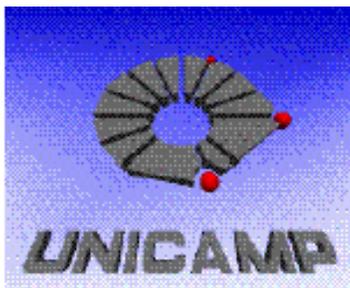


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA



Tese de Doutorado

**“Biodegradação aeróbia e anaeróbia de petróleo
do Campo Pampo Sul, Bacia de Campos, RJ”**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Campinas, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação do Instituto de Química, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Georgiana Feitosa da Cruz

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Campinas, 20 de março de 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

C889b Cruz, Georgiana Feitosa da.
Biodegradação aeróbia e anaeróbia de petróleo do
Campo Pampo Sul, Bacia de Campos, RJ / Georgiana
Feitosa da Cruz. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Bacia de Campos. 2. Atividade enzimática.
3. Petróleo. 4. Biossurfactante. I. Marsaioli, Anita
Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum from Pampo Sul Field, Campos Basin, RJ

Palavras-chaves em inglês: Campos Basin , Enzymatic activity, Petroleum, Biosurfactant

Área de concentração: Química-Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Anita Jocelyne Marsaioli (orientadora), Eugênio Vaz dos Santos Neto (CENPES-Petrobrás), Lúcia Maria Cunha Rebouças (IQB-UFAL), Luzia Koike (IQ-UNICAMP), Sebastião Ferreira Fonseca (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 20/03/2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Anita J. Marsaioli (Orientadora)

Dr. Eugênio Vaz dos Santos Neto (CENPES – Petrobras)

Profa. Dra. Lúcia Maria Cunha Rebouças (IQB – UFAL)

Profa. Dra. Luzia Koike (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Sebastião Ferreira Fonseca (IQ-UNICAMP)

Este exemplar corresponde à redação final da tese de Doutorado defendida pela aluna GEORGIANA FEITOSA DA CRUZ, aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de março de 2009.

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há homens que lutam um ano e são melhores.
Há homens que lutam anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Estes são imprescindíveis."*

Bertold Brecht.

Dedico este trabalho a meus pais e irmãos,
exemplos de amor, humildade, alegria de viver e
perseverança.

E ao meu amor, pelo companheirismo e por tornar
meus dias mais felizes.

A vocês, meu eterno agradecimento!!!

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus, o grande criador, pela presença constante em minha vida;
- ❖ Aos meus pais, Francisco José e Maria Dagmar, pelo amor incondicional, incentivo e confiança que dedicaram a mim. Tenho orgulho de vocês!!!
- ❖ Aos meus irmãos, Geórgia (Gueguinha), Geomárcia (Filha) e Geomar, pelo incentivo, pelas palavras de apoio e por estarem sempre presentes em minha vida. Amo vocês!!!
- ❖ À minha querida sobrinha Geysla pelos momentos de descontração no telefone, minha querida afilhada (e sobrinha) Marta Glória por todos os momentos de alegria que passamos juntas, pelo respeito e confiança e a minha mais nova afilhada, Geovana, que ainda não nasceu, mas já nos proporciona momentos de muita alegria e união familiar;
- ❖ Ao meu eterno amor, Alexsandro pelo incentivo, pelo carinho, companheirismo, e por estar sempre ao meu lado mesmo nos momentos de dificuldade. Amo Você!!!
- ❖ À minha orientadora Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli, pela orientação, pela confiança que depositou em mim, pelos ensinamentos de vida e, sobretudo pelo profissionalismo com que conduziu todas as etapas envolvidas neste trabalho;
- ❖ Ao Dr. Eugênio Vaz dos Santos Neto pelo apoio incondicional e pelas valiosas sugestões durante a realização deste trabalho;
- ❖ Aos Professores Francisco de Assis Machado Reis e Luzia Koike, pelo apoio e sugestões dadas;
- ❖ A Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira, pela colaboração, discussões e sugestões valiosas;

- ❖ Aos Professores Cláudio Tormena, Antônio C. Herrera, Paulo Imamura, Sebastião Fonseca, Fernando Coelho e José Augusto pelos ensinamentos durante a realização do PED;
- ❖ Aos demais professores do Instituto de Química, pelo aprendizado e colaboração;
- ❖ À Dona Maria, pela enorme presteza e carinho com que sempre me tratou;
- ❖ A minha querida amiga, Angélica, pela inestimável amizade, pelos conselhos e momentos de descontração durante o período de doutorado;
- ❖ Aos funcionários da CPG pela enorme presteza e carinho com que sempre me tratou;
- ❖ Aos amigos e colegas de pesquisa (antigos e novos): Simone (Si, amigona), Fernando Cabeça (Cabequinha), Carla Porto (Carlinha), Célio, Adriana Pianaro (Dri), Armando, Lucas, Cíntia I, Cíntia II, Pedro, Diana, Giédre, André, Eduardo, Luciana (Lu), Lucimar (Lu), Marcela (Ma), Sérgio (Coisinha), Adriana Flach (Adri) e Luiz Antônio, pela amizade e principalmente pela agradável convivência durante estes anos.
- ❖ Aos amigos que conquistei durante o período de doutorado: Aloízio Virgulino (Virgu), Elem, Fernanda, Humberto, Elaine, Sidney, Leonilda, Eduardo (Duda), Rafael (Rafa), João Borin, Rita, Bruna, Júlio, Ilton, pela amizade;
- ❖ Aos amigos (as) com quem residi em Campinas, Alex, Serginho, Socorro (Help), pelo bom relacionamento e amizade;
- ❖ Aos meus amigos conterrâneos Sidney, Leonilda, Edmilson, Kátia (e Sofia), Charllyton, Raquel, Carlos Henrique e Francinalda, pela inestimável amizade;

- ❖ Aos conterrâneos químicos que residem em Campinas, Socorro (Help), Clécio, Márcia, Alessandra, Herbert, Elidiane (Lili), Diana, Reginaldo, Lilia, Eva e Samuel pela amizade e momentos de descontração;
- ❖ As meus mais novos amigos Regina Célia, Fernanda, Monica, Lenise, Maurício e Rodrigo pelos momentos de descontração neste pouco tempo de convivência no Inmetro;
- ❖ À Petrobrás pelo suporte financeiro;
- ❖ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa e auxílios concedidos;
- ❖ Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!!!!

CURRICULUM VITAE

Georgiana Feitosa da Cruz

Endereço Eletrônico: gfeitosa05@hotmail.com ou geofec@gmail.com

Currículo na Plataforma Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1820045548668605>

1. FORMAÇÃO E TÍTULOS ACADÊMICOS

2005 - 2009 Doutorado em Ciências - Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), SP.

Área de Concentração: Química Orgânica

Título da Tese: “*Biodegradação aeróbia e anaeróbia de petróleo do Campo Pampo Sul, Bacia de Campos,RJ*”

2003 - 2005 Mestrado em Química Orgânica - Universidade Federal doPiauí (UFPI), PI.

Área de Concentração: Química Orgânica

Título da Dissertação: “*Contribuição ao estudo de biomarcadores em óleos da Bacia Sergipe-Alagoas*”

1997 - 2001 Licenciatura em Química - Universidade Federal do Piauí, PI.

2. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Empresa: Inmetro/RJ

Cargo: Pesquisadora

Período: Atual

Projeto de Pesquisa desenvolvido: “ *Análise de biodiesel por infusão direta utilizando um espectrômetro de massas híbrido (Q-TOF) com ionização por eletrospray (ESI-MS).*”

2.1. ATIVIDADES DE ENSINO

2006 – 2007 Programa de Estágio Docente (PED), Carga horária: 8 horas semanais; Disciplinas: Química Orgânica Experimental (Cursos de Farmácia, Engenharia Química e Química noturno). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

2003 - 2003 Estágio de docência para o curso de Graduação em Química (Licenciatura), Carga horária: 60h; Disciplina: Química Orgânica I. Universidade Federal do Piauí - UFPI.

2002 - 2003 Professora nos cursos de Graduação em Química e Física e Ciências e Informática; Carga horária: 90h/a, 90h/a e 60h/a, Disciplinas: Química Geral II, Química Orgânica I e Química Orgânica II. Universidade Estadual do Piauí - UESPI.

2.2. ATIVIDADES DE PESQUISA

2.2.1. Artigos completos publicados em periódicos (recentes)

1. de Vasconcellos, Suzan Pantaroto, Crespim, Elaine, **CRUZ, Georgiana Feitosa da**, Marques Simioni, Karen Christina, dos Santos Neto, Eugênio Vaz, Marsaioli, Anita Jocelyne, de Oliveira, Valéria Maia. Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry*, **2009** (*In Press*).

2. **CRUZ, Georgiana Feitosa da**, Santos Neto, E.V., Marsaioli, A. J. Petroleum degradation by aerobic microbiota from the Pampo Sul Oil Field, Campos Basin, Brazil. *Organic Geochemistry*,v.39 (8), p.1204 - 1209, **2008**.

2.2.2. Trabalhos publicados em anais de eventos (recentes)

1. **Da Cruz, G. F.**, Santos Neto, E.V., Marsaioli, A. J. Biodegradação de petróleo por microrganismos aeróbios produtores de substâncias exopoliméricas (EPS). *31ª RASBQ*. Águas de

Lindóia, 2008. (Melhor painel da seção de Química Biológica).

2. **Da Cruz, G. F.**, Marsaioli, A. J., Santos Neto, E.V. Produção e caracterização de biossurfactantes produzidos por microrganismos de reservatório de petróleo brasileiro. *31ª RASBQ*, 2008.
3. **Da Cruz, G. F.**, Marsaioli, A. J., Santos Neto, E.V. Multibioreação utilizada para investigar o potencial de oxidação de microrganismos isolados de petróleo. *IV Workshop de Biocatálise e Biotransformação*, São Carlos, 2008.
4. **Da Cruz, G. F.**, Santos Neto, E.V., Marsaioli, A. J. Pampo Sul petroleum aerobic and anaerobic degradation. *XI Congreso Latinoamericano de Geoquímica Orgánica*. Porlamar, Isla de Margarita, 2008.
5. **Da Cruz, G. F.**, Santos Neto, E.V., Marsaioli, A. J. Petroleum degradation studies using aerobic and anaerobic microbiota isolated from Pampo Field, Campos Basin, Brazil. *23 rd International Meeting on Organic Geochemistry*, Torquay, UK, 2007.
6. **Da Cruz, G. F.**, Pinheiro, L., Santos Neto, E.V., Marsaioli, A. J. Biotransformation potential of extremophiles, microorganisms from Campos Basin Field. *12th BMOS*, Itapema/SC, 2007.
7. **Da Cruz, G. F.**, Vasconcellos, S. P., Santos Neto, E.V., Marsaioli, A. J. Application of High Throughput Screening for the detection of enzymatic activities of petroleum bacteria from Campos Basin, Brazil. *10th ALAGO Congress on Organic Geochemistry*, Salvador, Bahia, 2006.
8. **Da Cruz, G. F.**, Vasconcellos, S. P., Santos Neto, E.V., Marsaioli, A. J. Petroleum anaerobic and aerobic degradation studies using bacteria from Pampo reservoir, Campos Basin, Brazil. *10th ALAGO Congress on Organic Geochemistry*, Salvador, Bahia, 2006.
9. **Da Cruz, G. F.**, Vasconcellos, S. P., Oliveira, L. G., Mantovani, S. M., Marsaioli, A. J. Fluorescence-based assays for detect Baeyer-Villiger monooxygenases in Brazilian microorganisms. *16th International Conference on Organic Synthesis*, Mérida, México 2006.
10. Mantovani, S. M., Vasconcellos, S. P., Oliveira, L. G., **Da Cruz, G. F.**, Marsaioli, A. J. High throughput screening for detection of hydrolytic enzymes in Brazilian microorganisms. *16th International Conference on Organic Synthesis*, Mérida, México, 2006.
11. **Da Cruz, G. F.**, Vasconcellos, S. P., Lu Shi Chen, Mantovani, S. M., Oliveira, V.M., Santos Neto, E.V., Marsaioli, A. J. Avaliação da atividade de epóxido hidrolases de microrganismos do petróleo da Bacia de Campos, RJ. *III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones*, São Paulo, 2006.
12. **Da Cruz, G. F.**, Vasconcellos, S. P., Mantovani, S. M., Reymond, J. L., Sicard, R., Oliveira, V.M., Santos Neto, E.V., Marsaioli, A. J. Detecção de Baeyer-Villiger monooxygenases em microrganismos de petróleo da Bacia de Campos, RJ. *III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones*, São Paulo, 2006.
13. **Da Cruz, G. F.**, Vasconcellos, S. P., Lu Shi Chen, Mantovani, S. M., Oliveira, V.M., Santos Neto, E.V., Marsaioli, A. J. Ensaios de triagem de alto desempenho para a detecção de esterases e lipases em bactérias do petróleo da Bacia de Campos, RJ. *III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones*. São Paulo, 2006.
14. **Da Cruz, G. F.**, Mantovani, S. M., Vasconcellos, S. P., Sicard, R., Reymond, J. L., Marsaioli, A. J. Utilização de técnicas de triagem de alto desempenho para detecção de Baeyer-Villiger monooxygenases em microrganismos brasileiros. *29ª RASBQ*, Águas de Lindóia, 2006.
15. **Da Cruz, G. F.**, Mantovani, S. M., Lu Shi Chen, Oliveira, V.M., Vasconcellos, S. P. Utilização de triagem de alto desempenho para detecção de epóxido hidrolases em microrganismos brasileiros. *29ª RASBQ*, Águas de Lindóia, 2006.

RESUMO

“BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA E ANAERÓBIA DE PETRÓLEO DO CAMPO PAMPO SUL, BACIA DE CAMPOS, RJ”

Palavras-chave: Bacia de Campos; Atividade enzimática; Petróleo; Biossurfactantes.

O principal objetivo desta tese foi investigar os processos de biodegradação do petróleo em reservatórios utilizando condições aeróbia, anaeróbia ou mista. Os experimentos de biodegradação foram adaptados à escala laboratorial, a fim de reproduzir as diferentes condições do reservatório, tendo o cuidado de selecionar os melhores parâmetros para acelerar em milhões de vezes o processo e assim avaliar a depleção dos biomarcadores em poucos meses comparado aos tempos geológicos. Isto foi obtido pelo aumento da densidade bacteriana que produziu a aceleração necessária do processo. A comparação de petróleos, um degradado naturalmente e outro em laboratório, apresentou evidências de que a reprodução do processo de biodegradação foi eficiente. A avaliação dos experimentos de biodegradação revelou que a microbiota aeróbia degrada preferencialmente *n*-alcanos com número par de carbonos, enquanto os anaeróbios preferem *n*-alcanos com número ímpar de carbono e a microbiota mista não mostra nenhuma preferência aparente. Em aerobiose, a ordem preferencial de biodegradação foi hidrocarbonetos > hopanos (com enriquecimento de 25-norhopanos) > esteranos > terpanos tricíclicos. Entre os homohopanos houve preferência pelos homólogos de maior peso molecular e a biodegradação de esteranos foi na ordem $\alpha\alpha\ 20R \gg \alpha\beta\beta\ 20R + \alpha\beta\beta\ 20S \geq \alpha\alpha\alpha\ 20S \gg$ diasteranos, diminuindo com o número de carbono [$C_{27} > C_{28} > C_{29}$]. Em anaerobiose a degradação preferencial foi hidrocarbonetos > esteranos > hopanos > 25-norhopanos > terpanos tricíclicos. Para os homohopanos a ordem de degradação foi diferente da observada em aerobiose com uma preferência para os homólogos de menor peso molecular e ordem de biodegradação para os esteranos foi a mesma observada em condições aeróbias. O experimento com consórcio misto revelou que a degradação em até 90 dias seguiu o padrão aeróbio e após 120 dias a situação mudou revelando características de degradação anaeróbia. A identificação dos microrganismos utilizando técnicas independente de cultivo revelou que a maioria dos microrganismos presentes nesses experimentos são aeróbios, mas com capacidade de sobreviver em condições anaeróbias. Durante o crescimento bacteriano, houve um aumento da solubilização do petróleo através da redução da tensão superficial devido à produção de substâncias exopoliméricas (EPS), que foram avaliadas levando à identificação de surfactina, um biopolímero produzido principalmente por espécies de *Bacillus*. Em suma, a principal contribuição do presente trabalho foi reproduzir em laboratório, sob condições aeróbia, anaeróbia e mista, o processo de biodegradação semelhantemente àquele encontrado em reservatórios.

ABSTRACT

"AEROBIC AND ANAEROBIC BIODEGRADATION OF PETROLEUM FROM PAMPO SUL FIELD, CAMPOS BASIN, RJ "

Keywords: Campos Basin , Enzymatic activity, Petroleum, Biosurfactant

The main purpose of this thesis was the simulation of petroleum biodegradation processes under reservoir aerobic, anaerobic or mixed conditions. The biodegradation experiments were first adapted to the laboratory scale in order to simulate different reservoir conditions taking care to select the best parameters to accelerate million times the biodegradation process to permit the evaluation of biomarker depletion in few months instead of geological times. This goal was obtained by increasing the bacterial density which produced the required process acceleration. Comparison of naturally biodegraded and laboratory degraded petroleum provided evidence that biodegradation process mimetization was successful. Comparison of the three degradation experiments revealed that aerobic microbiota preferentially degrades even carbon number *n*-alkanes, anaerobic preferred odd carbon number *n*-alkanes and mixed did not show any preference. Under aerobiosis the degradation preference was hydrocarbons > hopanes and homohopanes (25-norhopanes enrichment) > esteranes > tricyclic terpanes. Among homohopanes higher homologs were preferencialy depleted and the steranes biodegradation preference was $\alpha\alpha\alpha\ 20R \gg \alpha\beta\beta\ 20R + \alpha\beta\beta\ 20S \geq \alpha\alpha\alpha\ 20S \gg$ diasteranes, decreasing with the carbon number [$C_{27} > C_{28} > C_{29}$]. Under anaerobiosis the depletion preference was hydrocarbons > esteranes > hopanes e homohopanes > 25-norhopanes > tricyclic terpanes. For the homohopanes the degradation order was different from observed in aerobiosis with a preference for the low molecular weight homologs. Steranes biodegradation was not sensitive to aerobic or anaerobic conditions. The mixed aerobic experiment revealed that the degradation followed the aerobic pattern until 90 days and after 120 days the pattern changed to anaerobic like degradation. The identification of the microorganisms using cultivation independent techniques revealed that most microorganisms in these experiments were aerobic but could survive under anaerobic conditions . During bacterial growth there was an increasing oil solubilization by reduction in interfacial tension due to the production of exopolymeric substances (EPS) which were evaluated leading to the identification of surfactin a biopolymer mainly produced by *Bacillus* species. Finally the main contribution of this research was to reproduce in the lab the reservoir biodegradation under aerobic, anaerobic and mixed conditions.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xxvi
LISTA DE TABELAS.....	xxiv
LISTA DE FIGURAS.....	xxxiii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xl
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	xli
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	2
1.2 BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO.....	5
<i>1.2.1 CONDIÇÕES NECESSÁRIAS PARA OCORRER BIODEGRADAÇÃO.....</i>	<i>143</i>
<i>1.2.1.1. ACEPTORES DE ELÉTRONS E NUTRIENTES INORGÂNICOS.....</i>	<i>14</i>
<i>1.2.1.2. TEMPERATURA.....</i>	<i>16</i>
<i>1.2.1.2. MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO.....</i>	<i>17</i>
1.3 BIOSSURFACTANTES	21
<i>1.3.1 PROPRIEDADES DOS BISSURFACTANTES</i>	<i>25</i>
1.4 ÁREA DE ESTUDO – BACIA DE CAMPOS	26
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 CAPÍTULO 1 – MICROBIOTA AERÓBIA E ANAERÓBIA DE PETRÓLEO E ÁGUA DE FORMAÇÃO.....	35
<i>3.1.1 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSÓRCIOS.....</i>	<i>35</i>
<i>3.1.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....</i>	<i>43</i>
<i>3.1.3 MULTIBIOREAÇÕES.....</i>	<i>52</i>
3.2 CAPÍTULO 2 – BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO.....	66
<i>3.2.1 BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA (Co1 e Co2).....</i>	<i>70</i>

3.2.1.1. ANÁLISE DA FRAÇÃO NEUTRA SATURADA COM PETRÓLEO DISPERSO NO MEIO.....	73
3.2.1.1.1. n-ALCANOS E ISOPRENÓIDES.....	73
3.2.1.1.2. SESQUITERPANOS BICÍCLICOS.....	80
3.2.1.1.3. TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS.....	85
3.2.1.1.4. ESTERANOS REGULARES.....	107
3.2.1.2. ANÁLISE DA FRAÇÃO NEUTRA SATURADA COM PETRÓLEO ADSORVIDO EM AREIA.....	114
3.2.1.2.1. n-ALCANOS E ISOPRENÓIDES.....	114
3.2.1.2.2. SESQUITERPANOS BICÍCLICOS.....	119
3.2.1.2.3. TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS.....	121
3.2.1.2.4. ESTERANOS REGULARES.....	128
3.2.1.3. ANÁLISE DA FRAÇÃO NEUTRA SATURADA COM PETRÓLEO ADSORVIDO EM FOLHELHOS.....	132
3.2.1.3.1. n-ALCANOS E ISOPRENÓIDES.....	136
3.2.1.3.2. SESQUITERPANOS BICÍCLICOS.....	141
3.2.1.3.3. TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS.....	143
3.2.1.3.4. ESTERANOS REGULARES.....	150
3.2.2 BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA (AN).....	152
3.2.2.1. ANÁLISE DA FRAÇÃO NEUTRA SATURADA COM PETRÓLEO DISPERSO NO MEIO.....	155
3.2.2.1.1. n-ALCANOS E ISOPRENÓIDES.....	155
3.2.2.1.2. SESQUITERPANOS BICÍCLICOS.....	158
3.2.2.1.3. TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS.....	165
3.2.2.1.4. ESTERANOS REGULARES.....	168
3.2.2.2. ANÁLISE DA FRAÇÃO NEUTRA SATURADA COM PETRÓLEO ADSORVIDO EM MATRIZES (AREIA E FOLHELHOS).....	170
3.2.2.2.1. n-ALCANOS E ISOPRENÓIDES.....	170
3.2.2.2.2. SESQUITERPANOS BICÍCLICOS.....	175

3.2.2.2.3. TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS.....	177
3.2.1.2.4. ESTERANOS REGULARES.....	184
3.2.3 BIODEGRADAÇÃO MISTA (Co1AN e Co2AN).....	187
3.2.3.1. n-ALCANOS E ISOPRENÓIDES.....	190
3.2.3.2. SESQUITERPANOS BICÍCLICOS.....	193
3.2.3.3. TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS.....	194
3.2.3.4. ESTERANOS REGULARES.....	199
3.2.3.5. ANÁLISE DA FRAÇÃO NEUTRA INSATURADA.....	203
3.2.4 PARÂMETROS GEOQUÍMICOS OBTIDOS NA FRAÇÃO NEUTRA PARA TODOS OS EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	209
3.2.4.1. ANÁLISE DA FRAÇÃO ÁCIDA.....	229
3.3 CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DOS BIOSSURFACTANTES.....	234
3.3.1 DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA E EPS PRODUZIDOS.....	234
3.3.2 PERFIL DE CRESCIMENTO DOS CONSÓRCIOS.....	236
3.3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES (EPS).....	238
3.3.3.1. TEOR DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E ÁCIDOS URÂNICOS.....	241
3.3.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS BIOSSURFACTANTES.....	240
3.3.5 PROPRIEDADES DOS BIOSSURFACTANTES.....	244
3.3.5.1. MEDIDA DA TENSÃO SUPERFICIAL.....	247
3.3.5.2. MEDIDA DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO.....	249
3.3.6 BIODEGRADAÇÃO X PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES(EPS) ...	248
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	251
4.1 EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES EMPREGADAS.....	251
4.1.1 SOLVENTES, REAGENTES E MEIOS DE CULTURA.....	251
4.1.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA.....	251
4.1.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.....	252
4.1.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV-Vis).....	252
4.1.5 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA.....	252

4.1.6	<i>CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)</i>	252
4.1.7	<i>ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (MS-ESI)</i>	253
4.2	AMOSTRAS ESTUDADAS	253
4.3	PREPARO DE SOLUÇÕES E MEIOS MINERAIS	255
4.4	ENRIQUECIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS CONSÓRCIOS .	257
4.4.1	<i>OBTENÇÃO DOS CONSÓRCIOS E ISOLADOS AERÓBIOS</i>	258
4.4.2	<i>OBTENÇÃO DOS CONSÓRCIOS ANAERÓBIOS</i>	259
4.4.3	<i>OBTENÇÃO DOS CONSÓRCIOS MISTOS</i>	259
4.5	ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO	260
4.5.1	<i>BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA</i>	260
4.5.2	<i>BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA</i>	261
4.5.3	<i>BIODEGRADAÇÃO MISTA</i>	261
4.6	TRATAMENTO ANALÍTICO DOS ÓLEOS	264
4.6.1	<i>OBTENÇÃO DA FRAÇÃO NEUTRA (FN)</i>	264
4.6.2	<i>OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ÁCIDA</i>	275
4.7	MÉTODOS DE ANÁLISE	277
4.7.1	<i>CROMATOGRAFIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS</i>	277
4.8	PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DE SUBSTÂNCIAS EXOPOLIMÉRICAS (EPS)	283
4.8.1	<i>REATIVAÇÃO DOS CONSÓRCIOS</i>	283
4.8.2	<i>MÉTODOS ANALÍTICOS</i>	283
	<i>3.3.5.1.DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA E EPS PRODUZIDOS</i>	284
4.8.3	<i>ACOMPANHAMENTO DO CRESCIMENTO BACTERIANO E BIODEGRADAÇÃO DOS SUBSTRATOS</i>	284
4.8.4	<i>DOSAGEM DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E ÁCIDOS URÔNICO</i> S	285
4.8.4.1.	<i>DOSAGEM DE CARBOIDRATOS</i>	287
4.8.4.2.	<i>DOSAGEM DE PROTEÍNAS</i>	288
4.8.4.3.	<i>DOSAGEM DE ÁCIDOS URÂNICO</i> S.....	289
4.8.5	<i>PROPRIEDADES DOS BIOSSURFACTANTES</i>	289
4.8.5.1.	<i>MEDIDA DA TENSÃO SUPERFICIAL</i>	290

4.8.5.2. <i>MEDIDA DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO</i>	291
4.8.6 <i>EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EPS</i>	290
4.8.6.1. <i>EXTRAÇÃO</i>	291
4.8.6.2. <i>CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EPS</i>	292
4.9 TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO (HTS)	291
4.9.1 <i>REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS</i>	291
4.9.2 <i>PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA TRIAGEM</i>	292
4.9.2.1. <i>SOLUÇÕES ESTOQUE DAS SONDAS FLUOROGÊNICAS PARA MONOXIGENASES E HIDROLASES</i>	293
4.9.2.2. <i>SOLUÇÃO TAMPÃO BORATO</i>	293
4.9.2.3. <i>SOLUÇÃO DE PERIODATO DE SÓDIO</i>	294
4.9.2.4. <i>SOLUÇÃO DE BSA</i>	294
4.9.3 <i>TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO (HTS)</i>	294
4.9.3.1. <i>DETECÇÃO DE BAYER-VILLIGER MONOOXIGENASES</i>	295
4.9.3.2. <i>DETECÇÃO DE EPÓXIDO-HIDROLASES, ESTERASES E LIPASES</i> ..	296
4.9.4 <i>CURVA DE CALIBRAÇÃO DA UMBELIFERONA</i>	295
4.9.5 <i>METODOLOGIA PARA MULTIBIOREAÇÃO</i>	296
5 CONCLUSÕES	302
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	308

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
BSA	Albumina de Soro Bovino
BRS	Bactéria Redutora de Sulfato
BVMO	Baeyer-Villiger Monooxigenases
COT	Carbono Orgânico Total
CPMO	Ciclopentanona Monooxigenase
CMC	Concentração Micelar Crítica
CC	Cromatografia em Coluna
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
DO	Densidade Óptica
Ev	Elétrons Volt
MS/ESI	Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray
F	Fitano
FAc	Fração Ácida
FEM	Fração de Ésteres Metílicos
FN	Fração Neutra
HCS	Hidrocarbonetos
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
E	Índice de Emulsificação
IPC	Índice de Preferência de Carbono
IR	Índice de Retenção
IV	Infravermelho

NH	Norhopano
PI	Padrão Interno
P	Pristano
m/z	Razão entre a massa do fragmento e sua respectiva carga
RIC	<i>Reconstructed Ion Chromatogram</i>
v/v	Relação volume/volume
RPM	Rotações por minuto
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
EPS	Substâncias Exopoliméricas
TB	Taxa de Biodegradação
TI	Tensão Interfacial
TS	Tensão Superficial
TT	Terpano Tricíclico
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. BACTÉRIAS AERÓBIAS QUE UTILIZAM HIDROCARBONETOS COMO FONTE DE CARBONO	6
TABELA 2. BACTÉRIAS ANAERÓBIAS QUE UTILIZAM HIDROCARBONETOS COMO FONTE DE CARBONO	11
TABELA 3. ACEPTORES DE ELÉTRONS UTILIZADOS POR DIFERENTES MICRORGANISMOS NA BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS	16
TABELA 4. PRINCIPAIS CLASSES DE BISSURFACTANTES E MICRORGANISMOS PRODUTORES	23
TABELA 5. ALGUMAS APLICAÇÕES PARA BISSURFACTANTES	25
TABELA 6. BACTÉRIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS A PARTIR DAS AMOSTRAS DA COLETA 2.	36
TABELA 7. ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO DE MONOXIGENASES EM BACTÉRIAS ISOLADAS E CONSÓRCIOS AERÓBIOS A PARTIR DE AMOSTRAS DE PETRÓLEO.....	46
TABELA 8. ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO DE HIDROLASES EM BACTÉRIAS ISOLADAS E CONSÓRCIOS AERÓBIOS A PARTIR DE AMOSTRAS DE PETRÓLEO.....	47
TABELA 9. CONVERSÕES (%) OBTIDAS POR CG-EM PARA OS PRODUTOS OBTIDOS NA MULTIBIOREAÇÃO COM CÂNFORA E <i>CIS</i> -JASMONA	54
TABELA 10. SELETIVIDADE PARA OS ÉSTERES ACETATO, PROPIONATO E OCTANOATO DE FENILETILA, APÓS 50 % DE CONVERSÃO PARA O FENILETANOL	64
TABELA 11. ÍONS CARACTERÍSTICOS DAS CLASSES DOS BIOMARCADORES MONITORADOS NOS ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO	67
TABELA 12. TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO (%) PARA <i>N</i> -ALCANOS E ISOPRENÓIDES COM CONSÓRCIO AERÓBIO Co1	75
TABELA 13. TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO (%) PARA <i>N</i> -ALCANOS E ISOPRENÓIDES COM CONSÓRCIO AERÓBIO Co2	76
TABELA 14. TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS ANALISADOS ATRAVÉS DO ÍON-FRAGMENTO EM <i>M/Z</i> 191	88
TABELA 15. CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{G/G}$ F1) E TB (%) PARA TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS EM <i>M/Z</i> 191 COM CONSÓRCIO Co1.....	94
TABELA 16. CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{G/G}$ F1) E TB (%) PARA TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS EM <i>M/Z</i> 191 COM CONSÓRCIO Co2.....	96
TABELA 17. CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{G/G}$ F1) MOSTRANDO O ENRIQUECIMENTO, PARA A SÉRIE DE NORHOPANOS DETECTADOS ATRAVÉS DO SIM <i>M/Z</i> 191 E 177 COM OS CONSÓRCIOS AERÓBIOS Co1 E Co2.....	102
TABELA 18. ESTERANOS ANALISADOS ATRAVÉS DO ÍON-FRAGMENTO <i>M/Z</i> 217	108
TABELA 19. CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{G/G}$ F1) E TB (%) PARA ESTERANOS EM <i>M/Z</i> 217 COM Co1 E Co2	109

TABELA 20. TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO (TB, %) PARA <i>N</i> -ALCANOS E ISOPRENÓIDES UTILIZANDO P1 ADSORVIDO EM AREIA COM Co1	114
TABELA 21. TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO (TB, %) PARA <i>N</i> -ALCANOS E ISOPRENÓIDES UTILIZANDO P1 ADSORVIDO EM AREIA COM Co2	115
TABELA 22. CONCENTRAÇÃO (µG/G F1) E TB (%) PARA TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS MONITORANDO <i>M/Z</i> 191 COM P1 ADSORVIDO EM AREIA PARA Co1 E Co2 EM 30 E 60 DIAS	120
TABELA 23. CONCENTRAÇÃO (µG/G F1), MOSTRANDO O ENRIQUECIMENTO, PARA A SÉRIE DE NORHOPANOS DETECTADOS ATRAVÉS DO SIM EM <i>M/Z</i> 191 E 177 COM P1 ADSORVIDO EM AREIA PARA Co1 E Co2.....	124
TABELA 24. CONCENTRAÇÃO (µG/G F1) E TB (%) PARA ESTERANOS EM <i>M/Z</i> 217 COM P1 ADSORVIDO EM AREIA PARA Co1 E Co2.....	127
TABELA 25. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS FOLHELHOS FB, FSA E FSB (% EM PESO)	132
TABELA 26. TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO (%) PARA <i>N</i> -ALCANOS E ISOPRENÓIDES UTILIZANDO P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FSA COM Co1.....	136
TABELA 27. TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO (%) PARA <i>N</i> -ALCANOS E ISOPRENÓIDES UTILIZANDO P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FB COM Co2	137
TABELA 28. CONCENTRAÇÃO (µG/G F1) E TB (%) PARA TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS MONITORANDO <i>M/Z</i> 217 COM P1 ADSORVIDO EM FOLHELHOS FSA E FB PARA Co1 E Co2, RESPECTIVAMENTE	143
TABELA 29. CONCENTRAÇÃO (µG/G F1), MOSTRANDO ENRIQUECIMENTO, PARA A SÉRIE DE NORHOPANOS DETECTADOS ATRAVÉS DO SIM <i>M/Z</i> 191 E 177 COM P1 ADSORVIDO EM FOLHELHOS FSA E FB PARA Co1 E Co2.....	147
TABELA 30. CONCENTRAÇÃO (µG/G F1) E TB (%) PARA ESTERANOS EM <i>M/Z</i> 217 COM P1 ADSORVIDO EM FOLHELHOS FSA E FB PARA Co1 E Co2	150
TABELA 31. TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO (%) PARA <i>N</i> -ALCANOS E ISOPRENÓIDES UTILIZANDO P1 DISPERSO NO MEIO COM CONSÓRCIO ANAERÓBIO	154
TABELA 32. CONCENTRAÇÃO (µG/G F1) E TB (%) PARA TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS EM <i>M/Z</i> 191 COM CONSÓRCIO ANAERÓBIO E P1 DISPERSO NO MEIO	159
TABELA 33. CONCENTRAÇÃO (µG/G F1) E TB (%) PARA A SÉRIE DE NORHOPANOS DETECTADOS ATRAVÉS DO SIM <i>M/Z</i> 191 E <i>M/Z</i> 177 COM P1 DISPERSO NO MEIO PARA CONSÓRCIO ANAERÓBIO.....	164
TABELA 34. CONCENTRAÇÃO (µG/G F1) E TB (%) PARA ESTERANOS EM <i>M/Z</i> 217 COM P1 ADICIONADO DIRETO AO MEIO PARA CONSÓRCIO ANAERÓBIO	166
TABELA 35. TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO (%) PARA <i>N</i> -ALCANOS E ISOPRENÓIDES UTILIZANDO P1 ADSORVIDO EM AREIA E FOLHELHOS FSA E FB COM CONSÓRCIO ANAERÓBIO EM 90 E 180 DIAS.....	171

TABELA 36. CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{G/G}$ F1) E TB (%) PARA TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS MONITORANDO <i>M/Z</i> 191 COM P1 ADSORVIDO EM AREIA, FSA E FB EM ANAEROBIOSE	176
TABELA 37. CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{G/G}$ F1) E TB (%) PARA A SÉRIE DE NORHOPANOS DETECTADOS ATRAVÉS DO SIM <i>M/Z</i> 191 E <i>M/Z</i> 177 COM P1 ADSORVIDO EM MATRIZES UTILIZANDO CONDIÇÕES ANAERÓBIAS	180
TABELA 38. CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{G/G}$ F1) E TAXA DE BIODEGRADAÇÃO (TB %) PARA ESTERANOS EM <i>M/Z</i> 217 COM P1 ADSORVIDO EM DIFERENTES MATRIZES EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS	183
TABELA 39. TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO (%) PARA <i>N</i> -ALCANOS E ISOPRENÓIDES UTILIZANDO P1 DISPERSO NO MEIO COM CONSÓRCIO MISTO	189
TABELA 40. CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{G/G}$ F1) E TB (%) PARA TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS EM <i>M/Z</i> 191 COM CONSÓRCIO MISTO E P1 DISPERSO NO MEIO	193
TABELA 41. CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{G/G}$ F1) E TB (%) PARA A SÉRIE DE NORHOPANOS DETECTADOS ATRAVÉS DO SIM <i>M/Z</i> 191 E <i>M/Z</i> 177 COM P1 DISPERSO NO MEIO UTILIZANDO CONDIÇÕES MISTA DE BIODEGRADAÇÃO	196
TABELA 42. CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{G/G}$ F1) E TB (%) PARA ESTERANOS EM <i>M/Z</i> 217 COM P1 DISPERSO NO MEIO PARA O CONSÓRCIO MISTO	199
TABELA 43. PARÂMETROS GEOQUÍMICOS OBTIDOS PARA OS DIFERENTES TIPOS DE ENSAIO COM CONSÓRCIOS AERÓBIOS, ANAERÓBIO E MISTOS UTILIZANDO O ÍON FRAGMENTO <i>M/Z</i> 71	210
TABELA 44. PARÂMETROS GEOQUÍMICOS OBTIDOS PARA OS DIFERENTES TIPOS DE ENSAIO COM CONSÓRCIOS AERÓBIOS, ANAERÓBIO E MISTOS UTILIZANDO OS ÍONS-FRAGMENTOS <i>M/Z</i> 177, 191 E 217.....	216
TABELA 45. PRODUÇÃO DE EPS POR CONSÓRCIOS AERÓBIOS PROVINDOS DE PETRÓLEO BRASILEIRO	235
TABELA 46. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EPS (MG/ML) PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS AERÓBIOS PROVINDOS DE PETRÓLEO BRASILEIRO UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO	239
TABELA 47. ATIVIDADE EMULSIFICANTE ($E_{24}\%$) DE EPS PRODUZIDOS POR Co1 E Co2 E SURFACTANTE QUÍMICO (TWEEN 80) EM TOLUENO, <i>N</i> -OCTANO E DIESEL.	247
TABELA 48. TAXAS DE BIODEGRADAÇÃO DOS SUBSTRATOS AVALIADOS PELOS CONSÓRCIOS BACTERIANOS.	249
TABELA 49. CARACTERÍSTICAS GEOQUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ÓLEO UTILIZADAS PARA OBTENÇÃO DOS CONSÓRCIOS MICROBIANOS	254
TABELA 50. MASSAS OBTIDAS DA FRAÇÃO NEUTRA (FN) PARA TODOS OS EXPERIMENTOS.....	266
TABELA 51. MASSAS E RENDIMENTOS OBTIDOS DA FRAÇÃO ÁCIDA (FAC).	277

TABELA 52. VOLUME E PH UTILIZADOS PARA O PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO BÓRICO-BÓRAX..... 293

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. EVOLUÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DURANTE E APÓS SEDIMENTAÇÃO.....	3
FIGURA 2. ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA PETROLÍFERO ATUANTE NA BACIA DE CAMPOS.	4
FIGURA 3. ROTAS DE BIODEGRADAÇÃO DE ALCANOS PARA MICRORGANISMOS AERÓBIOS E ANAERÓBIOS	8
FIGURA 4. ROTA DE BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS.....	9
FIGURA 5. CAMINHO DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS A CH ₄ , CO ₂ E H ₂ S POR MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS.....	10
FIGURA 6. ROTA DE BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA PARA HIDROCARBONETOS VIA FUMARATO E CARBOXILAÇÃO A C-3.....	13
FIGURA 7. DIAGRAMA ILUSTRANDO A FORMAÇÃO DE BIOFILMES COM MULTI-ESPÉCIES..	20
FIGURA 8. DISTRIBUIÇÃO DE DIFERENTES MICRORGANISMOS PRESENTES NO BIOFILME DURANTE O PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA/ANAERÓBIA (MISTA) DO PETRÓLEO.....	20
FIGURA 9. ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS BIOSURFACTANTES.....	243
FIGURA 10. MAPA DE LOCALIZAÇÃO DA BACIA DE CAMPOS	28
FIGURA 11. BACTÉRIAS PRESENTES NO CONSÓRCIO AERÓBIO Co1 (A), ANAERÓBIO AN (B) E MISTO Co1AN (C)	42
FIGURA 12. CG-EM DE AMOSTRAS DE GASES PRODUZIDOS PELOS CONSÓRCIOS ANAERÓBIOS E MISTOS.....	45
FIGURA 13. SUBSTRATOS USADOS NAS MULTIBIOREACÕES.....	53
FIGURA 14. CROMATOGRAMA DE ÍONS (CG-EM) DE CÂNFORA [1] E CIS-JASMONA [2] UTILIZADOS NAS MULTIBIOREACÕES.....	53
FIGURA 15. ESPECTROS DE MASSAS DOS SUBSTRATOS (A) CÂNFORA E (B) CIS-JASMONA.	54
FIGURA 16. CROMATOGRAMA DE ÍONS (CG-EM) OBTIDO APÓS 168 H DE REAÇÃO COM <i>BACILLUS PUMILUS</i> SG01 UTILIZANDO CÂNFORA E CIS-JASMONA.	55
FIGURA 17. CROMATOGRAMA DE ÍONS (CG-EM) OBTIDO APÓS 168 H DE REAÇÃO COM Co1 UTILIZANDO CÂNFORA E CIS-JASMONA.	55
FIGURA 18. CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE BORNEOL, 7,8-EPOXIJASMONA E 4-HIDROXIJASMONA POR COINJEÇÃO DE PADRÕES SINTÉTICOS POR CG-EM.....	58
FIGURA 19. CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE 7-HIDROXIJASMONA E 7,8-DI-HIDROXIJASMONA POR COINJEÇÃO DE PADRÕES SINTÉTICOS POR CG-EM..	59
FIGURA 20. ESPECTROS DE MASSAS REPRESENTATIVOS PARA OS PRODUTOS 1A-2D OBTIDO NA PRIMEIRA MULTIBIOREACÃO A PARTIR DE CÂNFORA E CIS-JASMONA.	61
FIGURA 21. CROMATOGRAMA DE ÍONS (CG-EM) DOS SUBSTRATOS UTILIZADOS NA SEGUNDA MULTIBIOREACÃO PARA MONITORAR MONOOXIGENASES E HIDROLASES SIMULTANEAMENTE.....	61

FIGURA 22. ESPECTROS DE MASSAS DOS SUBSTRATOS (A) 2-METIL-CICLOEXANONA; (B) 1,2-EPOXIOCTANO; (C) ACETATO DE FENILETILA; (D) PROPRIONATO DE FENILETILA; (E) OCTANOATO DE FENILETILA.	63
FIGURA 23. CROMATOGRAMA DE ÍONS (CG-EM) OBTIDO APÓS 72 HORAS DE REACÃO COM <i>BACILLUS PUMILUS</i> SG 04.	64
FIGURA 24. CROMATOGRAMA DE ÍONS (CG-EM) OBTIDO APÓS 24 HORAS DE REACÃO COM Co ₂	64
FIGURA 25. ESPECTROS DE MASSAS DOS SUBSTRATOS (A) 2-METIL-CICLOEXANOL; (B) FENILETANOL DETECTADOS NA SEGUNDA MULTIBIOREAÇÃO.	66
FIGURA 26. CLASSIFICAÇÃO DO GRAU OU NÍVEL DE BIODEGRADACÃO EM AMOSTRAS DE ÓLEOS, DE ACORDO COM A EXTENSÃO DA BIODEGRADACÃO DOS BIOMARCADORES.	71
FIGURA 27. TIC DAS AMOSTRAS (A) P1, UTILIZADA NOS ENSAIOS E (B) P2, UTILIZADA COMO PARÂMETRO DE COMPARAÇÃO.	72
FIGURA 28. RIC <i>m/z</i> 71 MOSTRANDO O AUMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE P1 DISPERSO NO MEIO PELO Co ₁	75
FIGURA 29. RIC <i>m/z</i> 71 MOSTRANDO O AUMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE P1 DISPERSO NO MEIO PELO Co ₂	76
FIGURA 30. RIC <i>m/z</i> 123 DOS SESQUITERPANOS BICÍCLICOS DETECTADOS (A) NA AMOSTRA CONTROLE (T = 0) E (B) APÓS 60 DIAS DE INCUBAÇÃO COM Co ₁	82
FIGURA 31. RIC <i>m/z</i> 123 DOS SESQUITERPANOS BICÍCLICOS DETECTADOS (A) NA AMOSTRA CONTROLE (T = 0) E (B) APÓS 60 DIAS DE INCUBAÇÃO COM Co ₂	82
FIGURA 32. ESTRUTURAS PROPOSTAS COM BASE NOS ESPECTROS DE MASSA E IR DA LITERATURA PARA OS SESQUITERPANOS BICÍCLICOS DETECTADOS NOS ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO INCUBADOS COM Co ₁ E Co ₂	83
FIGURA 33. ESPECTROS DE MASSAS REPRESENTATIVOS PARA OS SESQUITERPANOS BICÍCLICOS, (A) PICO 10 E (B) PICO 14.	84
FIGURA 34. TERPANO TRICÍCLICO E SEUS PRINCIPAIS FRAGMENTOS DE MASSAS.	85
FIGURA 35. CICLIZAÇÃO ANAERÓBIA DE HEXAPRENOL PARA GERAR TRICICLOHEXAPRENOL, PRECURSOR DOS TERPANOS TRICÍCLICOS.	86
FIGURA 36. TERPANOS TETRACÍCLICOS FORMADOS A PARTIR DA DEGRADAÇÃO DE HOPANOS E SEUS FRAGMENTOS CARACTERÍSTICOS.	87
FIGURA 37. ESTRUTURA DO BACTERIOHOPANOTETROL – PRECURSOR DE HOPANOS.	88
FIGURA 38. SIM <i>m/z</i> 191 MOSTRANDO A BIODEGRADAÇÃO DE TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS PELO Co ₁ UTILIZANDO P1 DISPERSO NO MEIO.	89
FIGURA 39. SIM <i>m/z</i> 191 MOSTRANDO A BIODEGRADAÇÃO DE TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS PELO Co ₂ UTILIZANDO P1 DISPERSO NO MEIO.	90
FIGURA 40. ESPECTROS DE MASSAS PARA OS TERPANOS (A) TRICÍCLICO C ₂₃ , PICO 16, (B) TETRACÍCLICO C ₂₄ , PICO 19 E (C) PENTACÍCLIO C ₃₀ -HOPANO, PICO 30.	92
FIGURA 41. PRIMEIRA HIPÓTESE SUGERIDA PARA ORIGEM DE 25-NORHOPANOS.	94

FIGURA 42. SEGUNDA HIPÓTESE SUGERIDA PARA ORIGEM DE 25-NORHOPANOS.	95
FIGURA 43. TERCEIRA HIPÓTESE SUGERIDA PARA ORIGEM DE 25-NORHOPANOS.....	95
FIGURA 44. ESTRUTURAS E PRINCIPAIS FRAGMENTOS DOS COMPOSTOS TERPANOS PENTACÍCLICOS C ₂₅ -, C ₂₈ - E C ₃₀ -NORHOPANOS.....	99
FIGURA 45. SIM <i>m/z</i> 177 MOSTRANDO O LEVE ENRIQUECIMENTO DE NORHOPANOS PELO Co1 UTILIZANDO P1 DISPERSO NO MEIO DURANTE 60 DIAS DE MONITORAMENTO.)	100
FIGURA 46. SIM <i>m/z</i> 177 MOSTRANDO O LEVE ENRIQUECIMENTO DE NORHOPANOS PELO Co2 UTILIZANDO P1 DISPERSO NO MEIO DURANTE 60 DIAS DE MONITORAMENTO. .	101
FIGURA 47. ESPECTROS DE MASSAS PARA OS NORHOPANOS (A) 17 α (H),21 β (H)-C ₂₅ - NORHOPANO, PICO 27 E (B) 17 α (H),21 β (H)-C ₃₀ -NORHOPANO, PICO 28	103
FIGURA 48. FORMAÇÃO DE ESTERANOS A PARTIR DA REDUÇÃO DE ESTERÓIS DURANTE O PROCESSO DE DIAGÊNESE.....	104
FIGURA 49. SIM <i>m/z</i> 217 MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ESTERANOS NORMAIS E DIASTERANOS EM (B) 30 E (C) 60 DIAS DE MONITORAMENTO COM Co1 UTILIZANDO P1 DISPERSO NO MEIO.....	106
FIGURA 50. SIM <i>m/z</i> 217 MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ESTERANOS NORMAIS E DIASTERANOS EM (B) 30 E (C) 60 DIAS DE MONITORAMENTO COM Co2 UTILIZANDO P1 DISPERSO NO MEIO.....	107
FIGURA 51. RIC <i>m/z</i> 71 PARA MONITORAR A BIODEGRADAÇÃO DE P1 ADSORVIDO EM AREIA PELO Co1.)	112
FIGURA 52. RIC <i>m/z</i> 71 PARA MONITORAR A BIODEGRADAÇÃO DE P1 ADSORVIDO EM AREIA PELO Co2.....	113
FIGURA 53. RIC <i>m/z</i> 123 COM MONITORAMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DOS SESQUITERPANOS BICÍCLICOS DE P1 ADSORVIDO EM AREIA PARA (B) Co1 E (C) Co2 EM 60 DIAS DE MONITORAMENTO.	117
FIGURA 54. SIM <i>m/z</i> 191 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA MOSTRANDO A BIODEGRADAÇÃO DE TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS EM (B) 30 E (C) 60 DIAS DE MONITORAMENTO PELO Co1..	118
FIGURA 55. SIM <i>m/z</i> 191 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA MOSTRANDO A BIODEGRADAÇÃO DE TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS EM (B) 30 E (C) 60 DIAS DE MONITORAMENTO PELO Co2.	119
FIGURA 56. SIM <i>m/z</i> 177 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA COM Co1 EM (B) 30 E (C) 60 DIAS.....	122
FIGURA 57. SIM <i>m/z</i> 177 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA COM Co2 EM (B) 30 E (C) 60 DIAS.....	123
FIGURA 58. SIM <i>m/z</i> 217 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ESTERANOS NORMAIS E DIASTERANOS COM Co1 EM (B) 30 E (C) 60 DIAS.....	125

FIGURA 59. SIM DE <i>m/z</i> 217 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ESTERANOS NORMAIS E DIASTERANOS COM Co2 EM (B) 30 E (C) 60 DIAS..	126
FIGURA 60. MEV PARA OS FOLHELHOS (A) FB; (B) FSA E (C) FSB UTILIZADOS COMO MATRIZES NOS ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO.	130
FIGURA 61. GRÁFICOS OBTIDOS POR MEV MOSTRANDO A COMPOSIÇÃO DOS FOLHELHOS FB, FSA E FSB.	131
FIGURA 62. RIC <i>m/z</i> 71 PARA MONITORAR A BIODEGRADAÇÃO DE P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FSA PELO Co1.	134
FIGURA 63. RIC <i>m/z</i> 71 PARA MONITORAR A BIODEGRADAÇÃO DE P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FB PELO Co2.	135
FIGURA 64. SESQUITERPANOS BICÍCLICOS MONITORADOS ATRAVÉS DO ÍON <i>m/z</i> 123 NO ENSAIO COM P1 ADSORVIDO EM FSA COM Co1 EM 40 DIAS.	139
FIGURA 65. SESQUITERPANOS BICÍCLICOS MONITORADOS ATRAVÉS DO ÍON <i>m/z</i> 123 NO ENSAIO COM P1 ADSORVIDO EM FB COM Co2 EM 60 DIAS.	140
FIGURA 66. SIM <i>m/z</i> 191 PARA P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FSA MOSTRANDO A BIODEGRADAÇÃO DE TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS COM Co1.	141
FIGURA 67. SIM <i>m/z</i> 191 PARA P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FB MOSTRANDO A BIODEGRADAÇÃO DE TERPANOS TRICÍCLICOS, TETRACÍCLICOS E PENTACÍCLICOS COM Co2.	142
FIGURA 68. SIM <i>m/z</i> 177 PARA P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FSA COM Co1 EM (B) 30 E (C) 60 DIAS.	145
FIGURA 69. SIM <i>m/z</i> 177 PARA P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FB COM Co2 EM (B) 30 E (C) 60 DIAS.	146
FIGURA 70. SIM <i>m/z</i> 217 PARA P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FSA MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ESTERANOS NORMAIS E DIASTERANOS COM Co1 EM (B) 30 E (C) 60 DIAS.	148
FIGURA 71. SIM <i>m/z</i> 217 PARA P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FB MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ESTERANOS NORMAIS E DIASTERANOS COM Co2 EM (B) 30 E (C) 60 DIAS.	149
FIGURA 72. RIC <i>m/z</i> 71 MOSTRANDO A BIODEGRADAÇÃO DE P1 DISPERSO NO MEIO COM CONSÓRCIO ANAERÓBIO AN DURANTE 180 DIAS DE INCUBAÇÃO.	153
FIGURA 73. SESQUITERPANOS BICÍCLICOS MONITORADOS ATRAVÉS DO ÍON <i>m/z</i> 123 NO ENSAIO COM P1 DISPERSO NO MEIO COM CONSÓRCIO ANAERÓBIO EM (B) 90 E (C) 180 DIAS.	156
FIGURA 74. RIC <i>m/z</i> 191 PARA O CONSÓRCIO ANAERÓBIO COM P1 DISPERSO NO MEIO.	158
FIGURA 75. SIM <i>m/z</i> 177 PARA P1 DISPERSO NO MEIO COM CONSÓRCIO ANAERÓBIO EM (B) 90 E (C) 180 DIAS.	166

FIGURA 76. SIM <i>m/z</i> 217 PARA P1 DISPERSO NO MEIO MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ESTERANOS NORMAIS E DIASTERANOS COM CONSÓRCIO ANAERÓBIO AN.....	168
FIGURA 77. RIC <i>m/z</i> 71 PARA MONITORAR A BIODEGRADAÇÃO DE P1 ADSORVIDO EM AREIA COM CONSÓRCIO ANAERÓBIO. $nC_{13}-nC_{32} = N$ -ALCANOS; P = PRISTANO; F = FITANO.....	171
FIGURA 78. RIC <i>m/z</i> 71 PARA MONITORAR A BIODEGRADAÇÃO DE P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FSA COM CONSÓRCIO ANAERÓBIO..	172
FIGURA 79. RIC <i>m/z</i> 71 PARA MONITORAR A BIODEGRADAÇÃO DE P1 ADSORVIDO EM FOLHELHO FB PELO CONSÓRCIO ANAERÓBIO.	173
FIGURA 80. SESQUITERPANOS BICÍCLICOS MONITORADOS ATRAVÉS DO ÍON <i>m/z</i> 123 NO ENSAIO COM P1 ADSORVIDO EM (B) FB, (C) FSA E (D) AREIA PARA O CONSÓRCIO ANAERÓBIO EM 180 DIAS.	176
FIGURA 81. SIM <i>m/z</i> 191 PARA CONSÓRCIO ANAERÓBIO COM P1 ADSORVIDO EM (B) FB, (C) FSA E (D) AREIA EM 180 DIAS.....	175
FIGURA 82. SIM <i>m/z</i> 177 PARA P1 ADSORVIDO EM (B) FB, (C) FSA E (D) AREIA COM CONSÓRCIO ANAERÓBIO EM 180 DIAS.....	178
FIGURA 83. SIM <i>m/z</i> 217 PARA P1 ADSORVIDO EM (B) FB, (C) FSA E (D) AREIA, MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ESTERANOS E DIASTERANOS COM CONSÓRCIO ANAERÓBIO EM 180 DIAS.	185
FIGURA 84. QUANTIDADE DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO PARA OS CONSÓRCIOS ESTUDADOS COM DESTAQUE PARA OS CONSÓRCIOS MISTOS MOSTRANDO A OSCILAÇÃO AO LONGO DO TEMPO.....	188
FIGURA 85. RIC <i>m/z</i> 71 PARA MONITORAR A BIODEGRADAÇÃO DE P1 DISPERSO NO MEIO COM CONSÓRCIO MISTO..	191
FIGURA 86. SESQUITERPANOS BICÍCLICOS MONITORADOS ATRAVÉS DO ÍON <i>m/z</i> 123 NO ENSAIO COM P1 DISPERSO NO MEIO COM CONSÓRCIO MISTO (B) 90 E (C) 180 DIAS.	193
FIGURA 87. SIM <i>m/z</i> 191 MONITORANDO A BIODEGRADAÇÃO PELO CONSÓRCIO MISTO COM P1 DISPERSO NO MEIO (B) 90 E (C) 180 DIAS.....	195
FIGURA 88. SIM <i>m/z</i> 177 PARA P1 DISPERSO NO MEIO COM CONSÓRCIO MISTO EM (B) 90 E (C) 180 DIAS..	198
FIGURA 89. SIM <i>m/z</i> 217 PARA P1 DISPERSO NO MEIO MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ESTERANOS NORMAIS E DIASTERANOS COM CONSÓRCIO MISTO.....	198
FIGURA 90. ESTRUTURA DE ALQUILBENZENOS, ALQUILFENANTRENOS E ALQUILNAFTALENOS ENCONTRADO EM ÓLEOS E SEDIMENTOS.....	201
FIGURA 91. RIC <i>m/z</i> 92 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA COM CONSÓRCIO AERÓBIO MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ALQUIBENZENOS.	202

FIGURA 92. RIC <i>m/z</i> 105 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA COM CONSÓRCIO AERÓBIO MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ALQUIBENZENOS.....	203
FIGURA 93. RIC <i>m/z</i> 141 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA COM CONSÓRCIO AERÓBIO MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ALQUILNAFTALENOS.....	205
FIGURA 94. RIC <i>m/z</i> 155 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA COM CONSÓRCIO AERÓBIO MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ALQUILNAFTALENOS.....	206
FIGURA 95. RIC <i>m/z</i> 192 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ALQUILFENANTRENOS COM (B), (C), (D) CONSÓRCIO AERÓBIO, (E) MISTO E (F) ANAERÓBIO..	207
FIGURA 96. RIC <i>m/z</i> 206 PARA P1 ADSORVIDO EM AREIA MOSTRANDO O INCREMENTO DA BIODEGRADAÇÃO DE ALQUILFENANTRENOS COM (B), (C), (D) CONSÓRCIO AERÓBIO, (E) MISTO E (F) ANAERÓBIO..	208
FIGURA 97. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA A (A) FRAÇÃO ÁCIDA, FAC E (B) FRAÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS DERIVADOS DE ÁCIDOS, FEM.	227
FIGURA 98. RIC <i>m/z</i> 74 OBTIDO DA ANÁLISE POR CG-EM DA FRAÇÃO FEM DAS AMOSTRAS OBTIDAS NO ENSAIO AERÓBIO COM P1 ADSORVIDO EM AREIA.....	228
FIGURA 99. RIC <i>m/z</i> 123 OBTIDO DA ANÁLISE POR CG-EM DA FRAÇÃO FEM DAS AMOSTRAS OBTIDAS NO ENSAIO AERÓBIO COM P1 ADSORVIDO EM AREIA.....	230
FIGURA 100. ESPECTROS DE MASSAS E ESTRUTURAS SUGERIDAS PARA OS ÉSTERES METÍLICOS DERIVADOS DE ÁCIDO BÍCICLICOS (A) PICO 57 E (B) PICO 58, DETECTADOS NAS AMOSTRAS OBTIDAS DO ENSAIO COM CONSÓRCIO AERÓBIO CO1 E P1 ASDORVIDO EM AREIA.....	231
FIGURA 101. RIC <i>m/z</i> 191 OBTIDO DA ANÁLISE POR CG-EM DA FRAÇÃO FEM DAS AMOSTRAS OBTIDAS NO ENSAIO AERÓBIO COM P1 ADSORVIDO EM AREIA.....	232
FIGURA 102. ESPECTROS DE MASSAS E ESTRUTURAS SUGERIDAS PARA OS ÉSTERES METÍLICOS DERIVADOS DE ÁCIDOS TERPANÓICOS TRICÍCLICOS (A) PICO 59 E (B) PICO 60, DETECTADOS NAS AMOSTRAS OBTIDAS DO ENSAIO COM CONSÓRCIO AERÓBIO CO1 E P1 ASDORVIDO EM AREIA.....	233
FIGURA 103. CURVAS DE CRESCIMENTO DO CO1 FRENTE AOS SUBSTRATOS AVALIADOS.....	237
FIGURA 104. CURVAS DE CRESCIMENTO DO CO2 FRENTE AOS SUBSTRATOS AVALIADOS.....	237
FIGURA 105. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA MISTURA DE BISSURFACTANTES PRODUZIDA PELO CONSÓRCIO AERÓBIO.....	241
FIGURA 106. ESTRUTURA DA PRINCIPAL ISOFORMA DA SURFACTINA.....	242
FIGURA 107. ESPECTRO DE MASSAS DA (A) SURFACTINA E DO (B) BISSURFACTANTE PRODUZIDO PELO CONSÓRCIO AERÓBIO APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO.	243

FIGURA 108. MEDIDA DE TENSÃO SUPERFICIAL PARA CO1.....	245
FIGURA 109. MEDIDA DE TENSÃO SUPERFICIAL PARA CO2.....	245
FIGURA 110. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA GLICOSE UTILIZADA NA QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS PRESENTES NAS MOSTRAS DE BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS PELOS CONSÓRCIOS AERÓBIOS.....	287
FIGURA 111. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BSA UTILIZADA NA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PRESENTES NAS MOSTRAS DE BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS PELOS CONSÓRCIOS AERÓBIOS.....	288
FIGURA 112. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BSA UTILIZADA NA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS URÔNICOS PRESENTES NAS MOSTRAS DE BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS PELOS CONSÓRCIOS AERÓBIOS.....	290
FIGURA 113. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO ADOTADO PARA MEDIR O ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS PELOS CONSÓRCIOS AERÓBIOS.....	291
FIGURA 114. CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZADA NA CONVERSÃO DAS INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA EM CONCETRAÇÃO DE UMBELIFERONA NOS ENSAIOS DE HTS.	297

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SUBSTRATOS FLUORESCENTES UTILIZADOS NA DETECÇÃO DE BAEYER-VILLIGER MONOOXIGENASES, EPÓXIDO-HIDROLASES, ESTERASES E LIPASES.....	45
ESQUEMA 2. BIOTRANSFORMAÇÕES OCORRIDAS E ENZIMAS DETECTADAS NA MULTIBIOREAÇÃO COM CÂNFORA E <i>CIS</i> -JASMONA.	53
ESQUEMA 3. PRODUTOS E ENZIMAS DETECTADOS NA SEGUNDA MULTIBIOREAÇÃO COM SUBSTRATOS 3 E 5-7.....	62

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1. MÉTODO DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO NEUTRA.	264
FLUXOGRAMA 2. MÉTODO DE OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ÁCIDA E DE ÉSTERES METÁLICOS DERIVADOS DE ÁCIDOS.....	276

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A formação do petróleo está associada ao craqueamento térmico do querogênio, cuja composição depende da natureza da matéria orgânica e dos processos bacterianos e/ou térmicos sofridos durante o soterramento (Tissot & Welte, 1978). Para chegar à etapa de formação do petróleo a matéria orgânica pode sofrer degradação bioquímica pela atividade de microrganismos aeróbios e/ou anaeróbios (primeira fase evolutiva, Diagênese) ou pode ser termicamente alterada por soterramento e aquecimento a temperaturas na faixa de 50 a 150 °C (segunda fase evolutiva, Catagênese). Na Diagênese, os “restos” de plantas e animais são convertidos em querogênio e betume, que passam a ser um dos constituintes da rocha sedimentar. Durante esta fase o metano é o único hidrocarboneto gerado em quantidade significativa. Na Catagênese, o querogênio e o betume são convertidos em petróleo e gás. O final da Catagênese é alcançado quando o querogênio perde suas cadeias alifáticas. E na terceira fase evolutiva (Metagênese), alcançada sob temperaturas acima de 150-200 °C, a matéria orgânica apresenta potencial de geração representado basicamente por gás seco (metano) e, no final deste estágio, resta apenas um resíduo carbonoso (Thomas & Triggia, 2001; Peters *et al.*, 2005) [Figura 1].

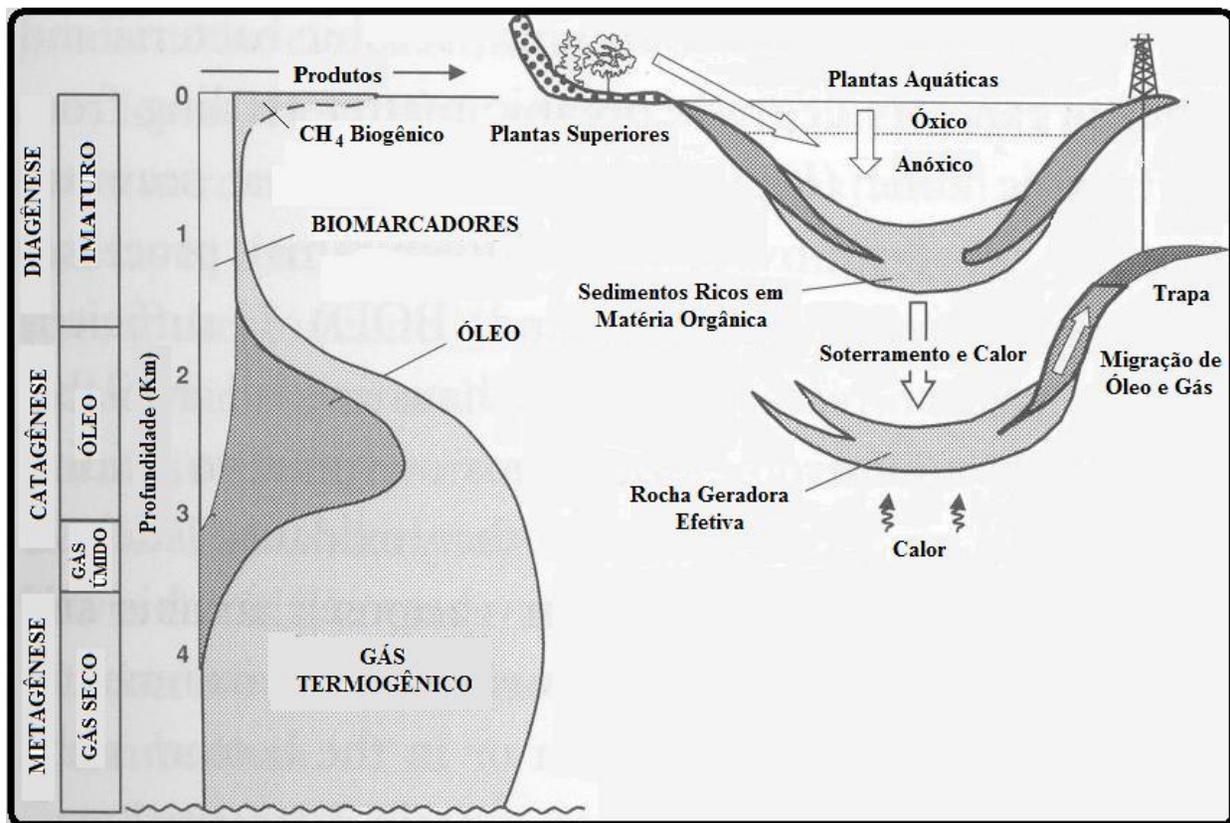


Figura 1. Evolução da matéria orgânica durante e após sedimentação. Muitos biomarcadores resistem às transformações ocorridas durante a diagenese e início da catagênese até a completa destruição no final da catagênese. A escala de profundidade pode variar dependendo do gradiente geotérmico e tipo de matéria orgânica. (adaptado de Peters *et al.*, 2005).

Juntamente com a matéria orgânica, outros sedimentos também são depositados dando origem à rocha geradora de petróleo [Figura 1]. Esta rocha deve conter um teor médio a elevado de matéria orgânica preservada com nível de maturação adequado para geração do óleo (Thomas & Triggia, 2001; Milles, 1989). O tipo de petróleo gerado depende fundamentalmente do tipo de matéria orgânica preservada nesta rocha e do estágio de evolução térmica. Por exemplo, matéria orgânica derivada de vegetais superiores tendem a gerar gás, enquanto o material derivado de zooplâncton e fitoplâncton, marinho ou lacustre, tende a gerar quantidades significativas de óleo (Tissot & Welt, 1984).

Após sua geração, o petróleo é expulso (processo de migração) da rocha geradora em direção à rocha reservatório onde se deposita para ser explorado e utilizado comercialmente (Restlé, 1994; Rodrigues, 2000) [Figura 2].

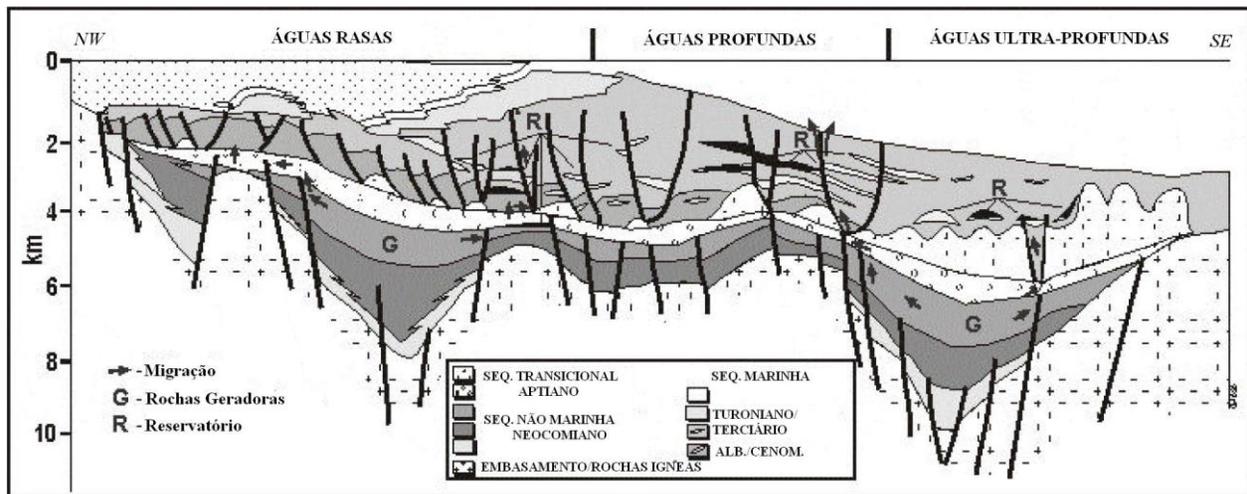


Figura 2. Ilustração esquemática do sistema petrolífero atuante na Bacia de Campos (adaptado de Milani *et al*, 2000).

Durante o processo de migração do petróleo podem ocorrer mudanças na sua composição devido à geocromatografia, solubilização em água (*water washing*), mudanças de fase e/ou extração de matéria orgânica presente nas rochas por onde ele passa (Trindade, 1992). As alterações devido à geocromatografia podem ocorrer porque o petróleo migra através das rochas sedimentares (que atuam como fase estacionária de uma coluna cromatográfica) podendo sofrer partição. Como o petróleo também está em constante contato com a água, seus componentes polares podem ser levemente solubilizados na fase aquosa (perdas em solução) levando a alterações na sua composição. Além disso, podem ocorrer separações de fases devido a variações de pressão, volume e temperatura. À medida que o petróleo migra e a pressão diminui, começa a formar duas fases (líquida e gasosa) e os componentes mais voláteis tendem a deixar a fase líquida (Trindade, 1992).

Estudos que ajudam à exploração eficaz de petróleo são auxiliados pela análise das diversas classes de biomarcadores utilizados em Geoquímica Orgânica (Philp, 1985; Mello *et al.*, 1988; Holba *et al.*, 2003; Brocks *et al.*, 2003a; Killops e Killops, 2005).

Os biomarcadores ou fósseis geoquímicos são originados a partir de organismos vivos e ocorrem como misturas complexas encontrados em petróleo, sedimentos e rochas (Peters & Moldowan, 1993; Restlé, 1994; Hauser & Dashti, 1999; Holba & Dzou, 2004). O estudo destes compostos é de grande relevância para a Geoquímica Orgânica porque fornecem informações sobre origem (Restlé, 1994; Brocks *et al.*, 2003a), ambiente deposicional (Philp, 1985; Peters & Moldowan, 1993; Brocks *et al.*, 2003b), evolução térmica (Tissot & Welte, 1978; Killops & Killops, 1993; Brocks *et al.*, 2003b) e índice de biodegradação das amostras analisadas. Só é possível obter este tipo de informação porque os biomarcadores mantêm uma relação direta com os organismos genitores e suas estruturas moleculares, quando incorporadas aos sedimentos, sofrem apenas transformações em seus grupos funcionais e ligações, preservando seus esqueletos carbônicos básicos (Tissot & Welte, 1978; Philp, 1985).

Embora seja possível utilizar os biomarcadores para diferentes aplicações, neste trabalho destacamos o uso apenas dos indicadores de biodegradação.

1.2 BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e naftênicos, além de outros compostos contendo enxofre, oxigênio, nitrogênio e constituintes organometálicos complexados com níquel e vanádio (van Hamme *et al.*, 2003).

Microrganismos de diferentes espécies, isoladamente ou em consórcios, possuem capacidade enzimática e preferências diferenciadas para degradar os constituintes do petróleo. Uns degradam preferencialmente alcanos normais, ramificados ou cíclicos, outros preferem mono ou poliaromáticos, e existem ainda aqueles que degradam tanto alcanos quanto aromáticos. Normalmente os alcanos variando de C₁₀ a C₂₆ são degradados primeiro, assim como os compostos aromáticos benzeno, tolueno e xileno (Atlas, 1995).

A **Tabela 1** mostra exemplos de algumas bactérias isoladas que utilizam hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia.

Tabela 1. Bactérias aeróbias que utilizam hidrocarbonetos como fonte de carbono

Bactéria	Hidrocarboneto	Referência
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> EB104	C ₉ -C ₁₈	Kleber <i>et al.</i> , 1983
<i>Acinetobacter</i> sp. M-1	C ₁₃ -C ₄₄	Sakai <i>et al.</i> , 1994
<i>Alcaligenes odorans</i> P20	-C ₃₃	Lal & Khanna, 1996
<i>Antrobacter nicotianae</i> KCC B35	C ₁₀ -C ₄₀	Radwan <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus thermoleovorans</i> B23 e H41	C ₉ -C ₃₀	Kato <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus thuringiensis/cereus</i> A2	C ₆ -C ₂₈	Chaerun <i>et al.</i> , 2004
<i>Dietzia psychrhalcaliphila</i>	C ₁₃ -C ₂₄	Yumoto <i>et al.</i> , 2002
<i>Marinobacter</i> sp. BC36	-C ₁₈	Bonin <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycobacterium</i> sp. PYR-1	Antraceno	Khan <i>et al.</i> , 2001
<i>Mycobacterium</i> sp. CH1	C ₁₂ -C ₂₈	Churchill <i>et al.</i> , 1999
<i>Nocarsiodes</i> sp. KP7	Fenantreno	Saito <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	C ₁₂ -C ₂₄	Smits <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas</i> sp. U2	Naftaleno	Fuenmayor <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhodococcus</i> sp.1BN	C ₆ -C ₂₈	Andreoni <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhodococcus</i> sp. 124	Tolueno	Treadway <i>et al.</i> , 1999
<i>Thermooleophilum album</i>	C ₁₃ -C ₂₀	Zarilla & Perry, 1984
<i>Xylella fastidiosa</i> RR15	C ₁₄ -C ₃₄	Yuste <i>et al.</i> , 2000

Fonte: Wentzel *et al.*, 2007; Van Hamme *et al.*, 2003.

A principal via metabólica de biodegradação de hidrocarbonetos por microrganismos aeróbios já é bem estabelecida na literatura e pode ocorrer na porção terminal e/ou subterminal da cadeia carbônica (Atlas, 1981; Berthe-Corti & Fetzner, 2002; Wentzel *et al.*, 2007). A etapa inicial é a oxidação do substrato por oxigenases com a utilização de oxigênio molecular comoceptor de elétrons. A oxidação terminal de um alcano inicia-se com a formação de um álcool primário. Após a etapa inicial, o álcool é oxidado, por ação das enzimas álcool e aldeído desidrogenases, aos correspondentes aldeído e ácido carboxílico, respectivamente. O ácido carboxílico, por sua vez, é utilizado como substrato para acil-CoA sintetase e é posteriormente biodegradado pelo processo de β -oxidação. A biodegradação subterminal (1° carbono secundário da cadeia do *n*-alcano) gera álcool secundário, cetona e éster. O éster pode ser biotransformado a álcool primário ou diretamente a ácido carboxílico por ação de esterases completando o ciclo até o processo de β -oxidação [Figura 3].

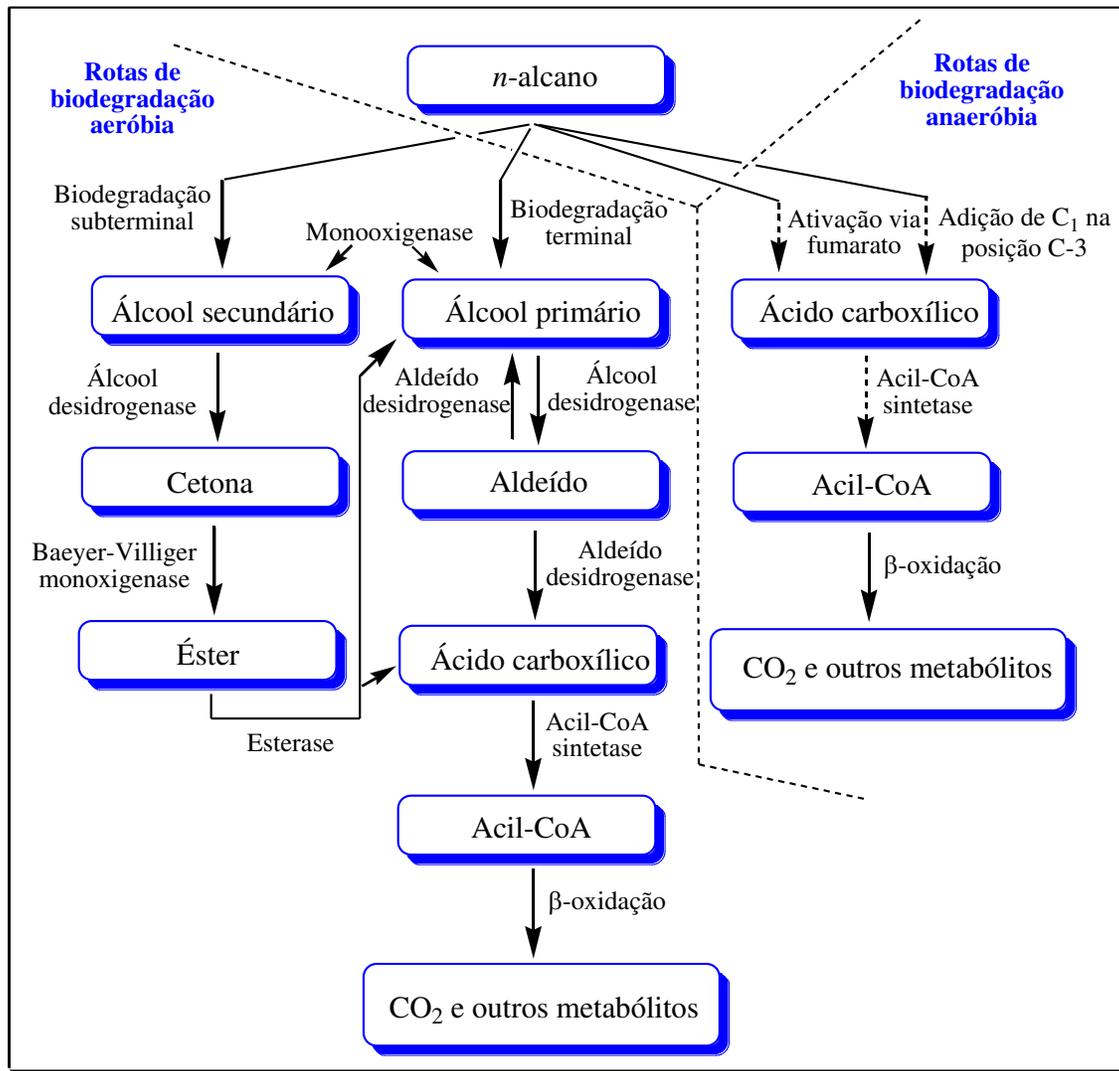


Figura 3. Rotas de biodegradação de alcanos para microrganismos aeróbios e anaeróbios (adaptado de Wentzel *et al.*, 2007).

A biodegradação de compostos aromáticos por microrganismos aeróbios também é iniciada pela ação de oxigenases (mono- ou dioxigenases) que promovem a oxidação do substrato formando dióis, seguida de clivagem do anel e formação de catecol que posteriormente é degradado formando diferentes intermediários, como acetaldeído, piruvato e succinato (Evans *et al.*, 1992; Berthecorti & Höpner, 2005) [Figura 4].

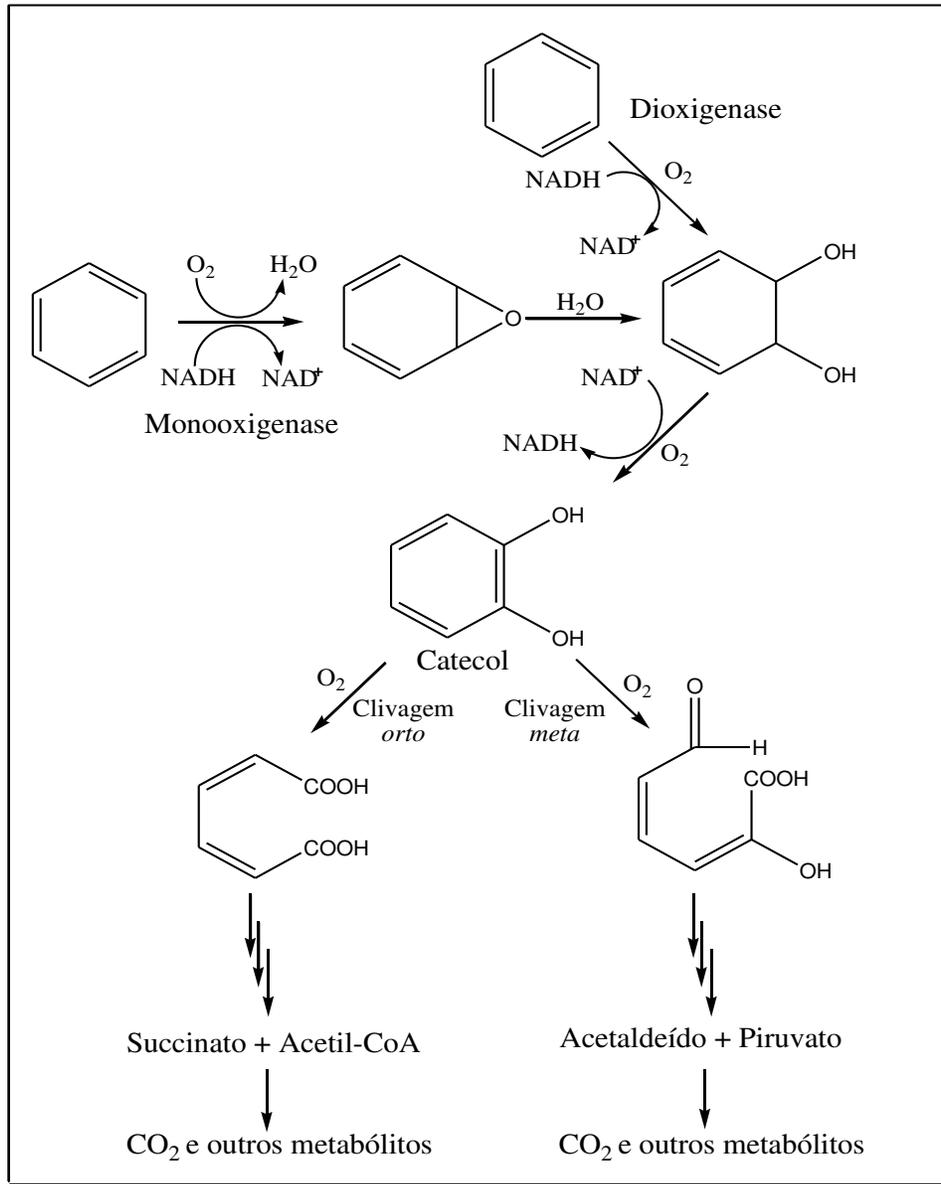


Figura 4. Rota de biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos (adaptado de Fritsche & Hofrichter, 2000).

O conhecimento das rotas de biodegradação para anaeróbios, no entanto, é limitado. Sob condições anóxicas, os compostos orgânicos são sucessivamente oxidados, ou seja, os produtos de cada etapa de oxidação atuam como substratos nas etapas seguintes, até que a matéria orgânica seja completamente degradada a biogás (Vazoller, 1995).

Existem vários relatos sobre a oxidação de hidrocarbonetos com culturas puras de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em condições estritamente anaeróbias (Aeckersberg *et al.*, 1991; Rueter *et al.*, 1994; So *et al.*, 2003; Cravo-Laureau *et al.*, 2005), denitrificantes (Ehrenreich *et al.*, 2000) e metanogênicas (Zengler *et al.*, 1999; Alain *et al.*, 2006). As BRS e denitrificantes utilizam sulfatos e nitratos, respectivamente, como aceptores de elétrons para biodegradar hidrocarbonetos, análogo ao oxigênio molecular na biodegradação aeróbia (Wentzel *et al.*, 2007). Já as bactérias metanogênicas metabolizam hidrocarbonetos ou na ausência de aceptores de elétrons, convertendo-os para metano e CO₂ ou na presença de CO₂ convertendo os hidrocarbonetos para CH₄ (Widdel & Rabus, 2001). Existem, ainda, as bactérias anaeróbias acetogênicas que consomem os hidrocarbonetos gerando acetato e H₂ (Zengler *et al.*, 1999) [Figura 5].

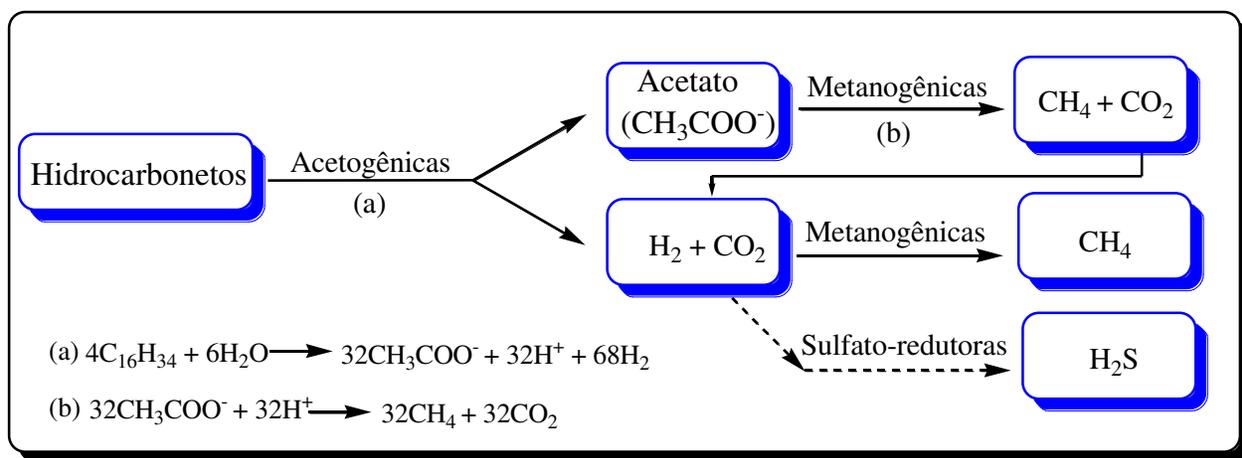


Figura 5. Caminho de degradação de hidrocarbonetos a CH₄, CO₂ e H₂S por microrganismos anaeróbios (adaptado de Zengler *et al.*, 1999 e Jones *et al.*, 2008).

A **Tabela 2** mostra algumas destas bactérias que são capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono em ambientes anóxicos.

Tabela 2. Bactérias anaeróbias que utilizam hidrocarbonetos como fonte de carbono

Bactéria	Hidrocarboneto	Tipo de metabolismo	Referência
<i>Azoarcus</i> sp. EB1	Etilbenzeno	Denitrificante	Ball <i>et al.</i> , 1996
<i>Dechloromass</i> sp. JJ	Benzeno, tolueno	Denitrificante	Coates <i>et al.</i> , 2001
Cepa OcN1	C ₈ -C ₁₂	Denitrificante	Ehrenreich <i>et al.</i> , 2000
<i>Marinobacter</i> sp. BC36	-C ₁₈	Denitrificante	Bonin <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas</i> sp. NAP-3	Naftaleno	Denitrificante	Rockne <i>et al.</i> , 2000
<i>Marinobacter</i> sp. BC42	C ₆ -C ₁₅	Denitrificante	Bonin <i>et al.</i> , 2004
Cepa TD3	C ₈ -C ₁₂	Sulfato-redutora	Rueter <i>et al.</i> , 1994
Cepa Hxd3	C ₁₂ -C ₂₀	Sulfato-redutora	Aeckersberg <i>et al.</i> , 1991
Cepa Pnd3	C ₁₄ -C ₁₇	Sulfato-redutora	Aeckersberg <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfobacterium cetonicum</i>	Tolueno	Sulfato-redutora	Rabus <i>et al.</i> , 2001
<i>Desulfatibacillum aliphaticivorans</i> CV2803	C ₁₃ -C ₁₈	Sulfato-redutora	Cravo-Laureau <i>et al.</i> , 2004
Clone B1-B3	-C ₁₆	Metanogênica	Zengler <i>et al.</i> , 1999

Adaptado de van Hamme *et al.*, 2003 & Wentzel *et al.*, 2007.

Os mecanismos de biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos utilizando consórcios de microrganismos e bactérias isoladas são bastante estudados, porém pouco entendidos. Em geral, dois mecanismos de ativação tanto para alcanos quanto para aromáticos tem sido proposto: o primeiro envolve a ativação do carbono subterminal do hidrocarboneto e adição de fumarato e no segundo mecanismo, o hidrocarboneto é carboxilado na posição C-3 (Wilkes *et al.*, 2002; So

et al., 2003; Aitken, 2004; Peters *et al.*, 2005; Wentzel *et al.*, 2007) [**Figura 3**, pág. 7]. Ambos os caminhos podem ocorrer simultaneamente em consórcios de BRS.

Quando a biodegradação ocorre através do primeiro mecanismo de ativação, o hidrocarboneto é adicionado à dupla ligação do fumarato via átomo de carbono subterminal gerando ácidos graxos lineares e ramificados e succinatos substituídos (Kropp *et al.*, 2000; Rabus *et al.*, 2001; Cravo-Laureau *et al.*, 2005). Os ácidos graxos lineares gerados com números pares de carbono provêm de *n*-alcanos também com números pares de carbono e os ácidos graxos com números de carbono ímpares é gerado a partir de *n*-alcanos com números ímpares de carbono. No segundo mecanismo ocorre formação apenas de ácidos graxos lineares, porém os *n*-alcanos pares geram os ácidos graxos ímpares e vice-versa. A **Figura 6** mostra os dois mecanismos envolvidos nos processos de biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos.

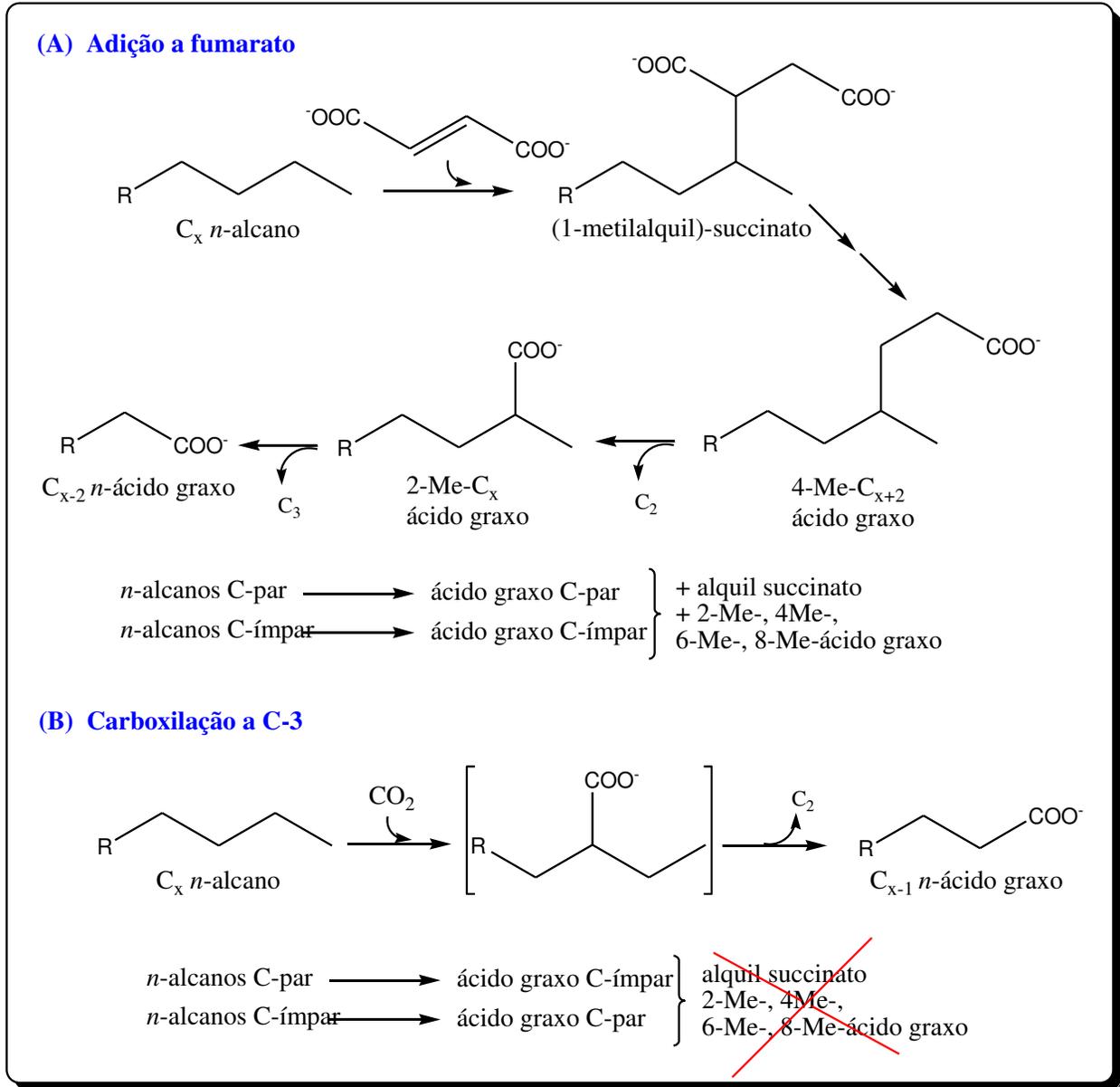


Figura 6. Rota de biodegradação anaeróbia para hidrocarbonetos via fumarato e carboxilação a C-3 (adaptado de Grossi *et al.*, 2008).

Independente do mecanismo e do tipo de enzima envolvida, algumas condições são necessárias para favorecer um ou outro tipo de biodegradação (aeróbia e/ou anaeróbia) do petróleo.

1.2.1 CONDIÇÕES NECESSÁRIAS PARA OCORRER BIODEGRADAÇÃO

A maior parte do petróleo do mundo é total ou parcialmente biodegradado em reservatórios e este processo pode levar milhões de anos para ocorrer (Head *et al.*, 2003). Para se ter um melhor entendimento dos mecanismos de biodegradação do óleo é necessário utilizar condições ideais para que o processo ocorra em curtos intervalos de tempo, quando comparado ao tempo geológico (Connan, 1984; Palmer, 1993; Blanc & Connan, 1994). Em geral, para que ocorra biodegradação de petróleo é necessário (Peters *et al.*, 2005):

- ❖ Presença de aceptores de elétrons (ex. oxigênio molecular, nitratos, sulfatos, íons férricos) e nutrientes inorgânicos (ex. fósforo, traço de metais);
- ❖ A rocha geradora deve ter porosidade e permeabilidade suficientes para permitir a difusão de nutrientes e motibilidade de microrganismos;
- ❖ A temperatura do reservatório não deve ultrapassar ~80 °C;
- ❖ A salinidade da água de formação deve estar na faixa de ~100-150 ‰;
- ❖ Presença de microrganismos capazes de degradar componentes do petróleo;
- ❖ Ausência de “venenos naturais”, isto é, de microrganismos não biodegradadores de hidrocarbonetos que são tolerantes às condições dos reservatórios e que inibem e/ou limitam o crescimento e atividade enzimática de microrganismos degradadores de petróleo.

Se todas estas condições estão presentes, o petróleo é alterado pelos microrganismos levando a uma diminuição da sua qualidade. Este processo de biodegradação causa diminuição do teor de hidrocarbonetos saturados, aumento da

viscosidade, conteúdo de enxofre, acidez e metais, afetando o valor econômico do óleo (Head *et al.*, 2003).

Enquanto os efeitos da biodegradação na composição molecular e propriedades físicas do óleo são relativamente bem conhecidos, a influência de oxidantes, quantidade de oxigênio no meio, quantidade de óleo, propriedades fisiológicas e potencial bioquímico de microrganismos e, em alguns casos, a natureza dos produtos formados, ainda permanece obscuro (Röling *et al.*, 2003). Como a biodegradação afeta a qualidade do óleo, é fundamental entender melhor a influência de todos estes fatores durante o processo de biodegradação do petróleo.

1.2.1.1 Aceptores de elétrons e nutrientes inorgânicos

Um dos fatores primordiais para ocorrer biodegradação é a presença de aceptores de elétrons e nutrientes adequados para manter ativos microrganismos de diferentes espécies.

Os microrganismos aeróbios necessitam da presença de oxigênio molecular para seu crescimento e para converter os hidrocarbonetos em CO₂, H₂O e biomassa. Já os microrganismos facultativos podem crescer na presença (aerobiose) ou ausência (anaeróbios, fermentação) de oxigênio (Berthe-Corti & Fetzner, 2002; Peters *et al.*, 2005).

Os anaeróbios estritos utilizam diferentes aceptores como, nitratos (NO₃⁻), sulfatos (SO₄²⁻) e íons férricos (Fe³⁺) para metabolizar hidrocarbonetos. Enquanto, outros anaeróbios (aerotolerantes) crescem na presença de concentrações-traços de oxigênio dissolvido, porém não utilizam este gás metabolicamente (Madigan *et al.*, 1997; Berthe-Corti & Fetzner, 2002).

Além disso, existem aqueles microrganismos que requerem aceptores de elétrons específicos, como os fermentadores ou acetogênicos que utilizam acetatos

(CH_3COO^-) para converter os hidrocarbonetos em CH_4 e CO_2 (Berthe-Corti & Fetzner, 2002).

A **Tabela 3** mostra alguns microrganismos, seus aceptores de elétrons e os principais produtos gerados a partir da biodegradação de componentes do petróleo (Holland *et al.*, 1987).

Tabela 3. Aceptores de elétrons utilizados por diferentes microrganismos na biodegradação de hidrocarbonetos

Microrganismos	Aceptores de elétrons	Produtos
Aeróbios	O_2	CO_2
Metanogênicas	-	CH_4 e CO_2
Metanogênicas	CO_2	CH_4
BRS	SO_4^{2-}	H_2S
Denitrificantes (<i>Veillonella alcalescens</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Clostridium perfringens</i>)	NO_3^-	NO_2^-
Denitrificantes (<i>Propionibacterium pentosaceum</i>)	NO_2^-	N_2
Outros anaeróbios	Fumarato	Succinato

Adaptado de Holland *et al.*, 1987.

Na ausência de aceptores de elétrons, tais como sulfato e nitrato, os hidrocarbonetos são transformados em produtos finais (metano e CO_2), através da interação de vários grupos de microrganismos, como, por exemplo, bactérias fermentativas, acetogênicas produtoras de hidrogênio, metanogênicas

hidrogenotróficas e acetoclásticas [**Figura 5, pág.9**] (Colleran *et al.*, 1994; Oude Elferink *et al.*, 1997).

Nutrientes inorgânicos, tais como nitrogênio (N) e fósforo (P) são essenciais na biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios. Traços de metais, como molibdênio (Mo), cobalto (Co) e cobre (Cu) são importantes em reações enzimáticas. Tanto os nutrientes inorgânicos, quanto alguns metais podem limitar o processo de biodegradação do petróleo (Peters *et al.*, 2005).

1.2.1.2 Temperatura

A temperatura ótima para ocorrer biodegradação de petróleo no reservatório é ~ 60-80 °C (Evans *et al.*, 1971; Peters *et al.*, 2005), entretanto simulações laboratoriais indicam que a biodegradação de hidrocarbonetos ocorre pela ação de microrganismos que crescem a diferentes temperaturas, tais como, psicrófilos (0-25 °C), mesófilos (30-40 °C) e termófilos (50-60 °C) (Berthe-Corti & Fetzner, 2002). Exemplificando, Walker & Colwell (1976) demonstraram a biodegradação de alcanos, por microrganismos obtidos a partir de água de formação e sedimentos, na faixa de temperaturas entre 0-10 °C, enquanto Rueter *et al.* (1994), isolou uma BRS termofílica que biodegrada alcano a temperaturas acima de 60 °C.

A influência da temperatura na biodegradação de hidrocarbonetos depende, portanto, do tipo de microrganismo e das condições utilizadas no processo.

1.2.1.3 Microrganismos envolvidos no processo de biodegradação do petróleo

Desde o início da produção comercial de petróleo, os geoquímicos têm se deparado com problemas relacionados à presença de microrganismos nos reservatórios (Magot *et al.*, 2000). Microrganismos são os grandes responsáveis pela deterioração de petróleo, que está relacionada não somente com a biodegradação de hidrocarbonetos, mas também com a corrosão de equipamentos e tanques de estocagem devido aos subprodutos originados da biodegradação (Cord-Ruwich *et al.*, 1987).

Os hidrocarbonetos podem ser seletivamente consumidos no reservatório durante o processo de biodegradação, que ocorre a diferentes temperaturas e pressões. Contudo os microrganismos envolvidos neste processo ainda são objetos de discussões conflitantes uma vez que se atribui a degradação tanto aos aeróbios (Orphan *et al.*, 2000; Bonch-Osmolovakaya *et al.*, 2003; Borzenkov *et al.*, 2006) quanto aos anaeróbios (Coates *et al.*, 1997; Korda *et al.*, 1997; Voordouw *et al.*, 1996). Aqueles que defendem a ação dos microrganismos aeróbios assumem que a temperatura durante o processo está entre 60-80 °C e envolve a incursão de águas meteóricas que carrega oxigênio e nutrientes necessários a manutenção destes microrganismos dentro do reservatório (Evans *et al.*, 1971), enquanto aqueles favoráveis à degradação anaeróbia indicam que a demanda de oxigênio no reservatório é insuficiente para manter os aeróbios ativos e, portanto, os microrganismos que degradam o petróleo são estritamente anaeróbios, degradando os componentes do petróleo mais lentamente (Magot *et al.*, 2000; Röling *et al.*, 2003; Aitken *et al.*, 2004).

No entanto, as evidências científicas encontradas nas pesquisas desenvolvidas pelo nosso grupo indicam que estes dois grupos de microrganismos

biodegradam o petróleo através de ação sinérgica em tempos geológicos diferentes, onde um complementa o outro sem sobreposição (Da Cruz *et al.*, 2008). Os componentes do petróleo e outros metabólitos presentes no reservatório que são recalcitrantes para os aeróbios são facilmente biodegradados pelos anaeróbios e, por outro lado, àqueles que são de difícil degradação pelos anaeróbios podem ser completamente biodegradados pelos aeróbios (Long *et al.*, 1993).

Levando-se em consideração a existência de microorganismos anaeróbios que produzem oxigênio pela redução de percloratos ($\text{ClO}_4^- \rightarrow \text{ClO}_3^- \rightarrow \text{ClO}_2^- \rightarrow \text{Cl}^- + \text{O}_2$) (Xu *et al.*, 2004), nossa hipótese parte do princípio que o oxigênio produzido por estes microrganismos é armazenado em biofilmes na interface óleo-água. Estes biofilmes agem como “esponja” contendo teores variáveis de oxigênio e outros gases beneficiando os anaeróbios em baixos teores de oxigênio e os aeróbios quando os teores de oxigênio forem altos. Os microrganismos aeróbios consomem este oxigênio durante o processo de biodegradação do petróleo, levando gradativamente a uma atmosfera anóxica onde há predominância dos anaeróbios que voltam a degradar os hidrocarbonetos, continuando assim o ciclo de degradação do petróleo.

É importante considerar que os biofilmes são sistemas biológicos altamente organizados onde os microrganismos sobrevivem e crescem como agregados celulares. Nestes sistemas eles se encontram envolvidos em uma matriz de substâncias exopoliméricas (EPS) que é responsável pela estrutura, coesão e propriedades físico-químicas que os mantêm como agregados celulares (Flemming *et al.*, 2002; Rickard *et al.*, 2003) [**Figura 7**].

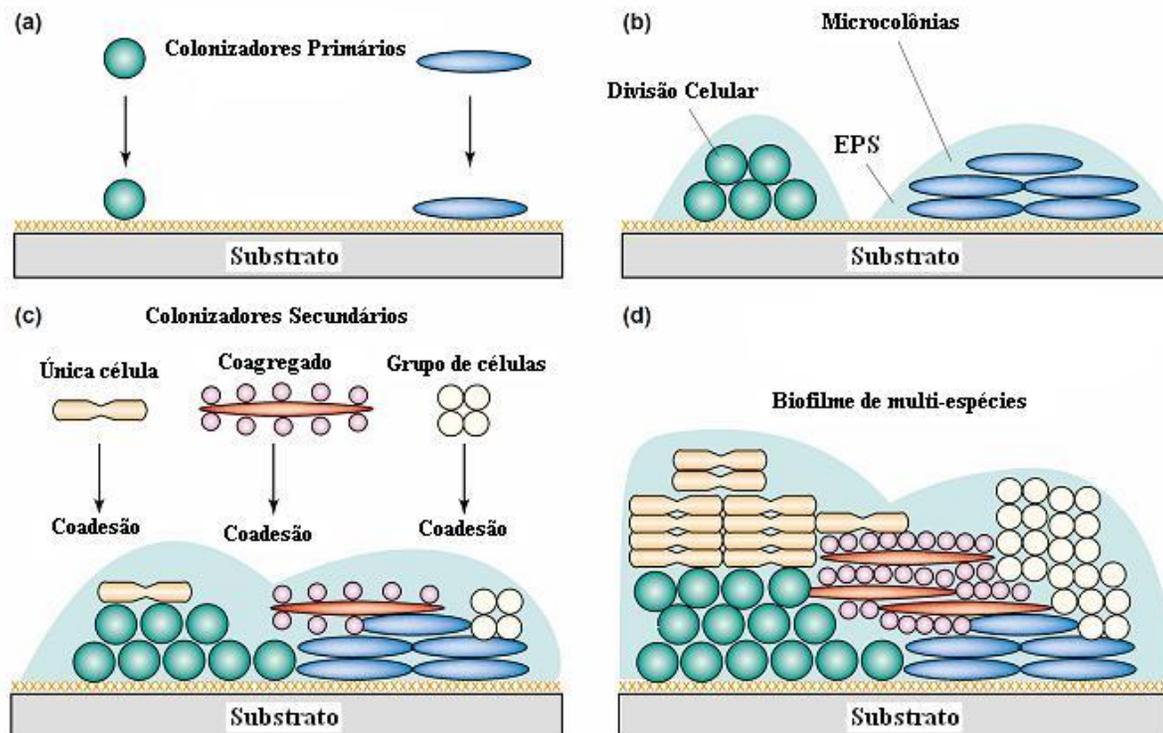


Figura 7. Diagrama ilustrando a formação de biofilmes com multi-espécies. (a) colonização primária do substrato pelos microrganismos; (b) crescimento, divisão celular e produção de substâncias exopoliméricas (EPS) levando ao desenvolvimento de microcolônias; (c) coadesão de uma única célula, de coagregados celulares ou de um grupo de células idênticas provocando aumento das espécies presentes no biofilme; (d) maturação do biofilme multicelular (adaptado de Rickard *et al.*, 2003).

Para explicar a coexistência de microrganismos aeróbios e anaeróbios (consórcio misto) e para evitar a toxicidade do oxigênio aos microrganismos não tolerantes (principalmente arqueias metanogênicas e bactérias acetogênicas), Shen & Guiot (1996) apresentaram modelos conceituais para a distribuição em multicamadas das comunidades microbianas predominantes que podem ocorrer em biofilmes estruturados. Num desses modelos, eles mostram que os microrganismos aeróbios e facultativos são predominantes na camada periférica, enquanto os microrganismos anaeróbios, sensíveis ao oxigênio, estão localizados na camada interior. Portanto, o oxigênio presente é consumido pelos microrganismos aeróbios

e bactérias facultativas antes de atingir o centro do biofilme e inibir a ação dos anaeróbios estritos [Figura 8].

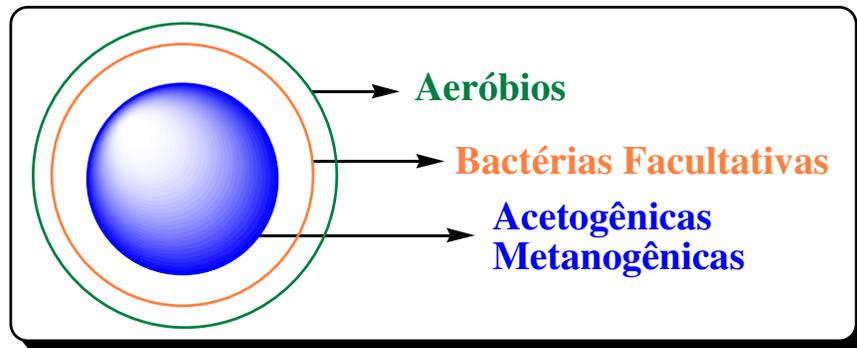


Figura 8. Distribuição de diferentes microrganismos presentes no biofilme durante o processo de biodegradação aeróbia/anaeróbia (mista) do petróleo. O oxigênio é consumido pelos microrganismos aeróbios (**verde**) e facultativos (**laranja**) antes de atingir os microrganismos anaeróbios estritos (**azul**) no interior do biofilme (adaptado de Shen & Guiot, 1996).

O biofilme protege os anaeróbios da toxicidade do oxigênio porque sua espessura e arquitetura representam uma barreira física para a difusão deste e de outros gases, criando zonas segregadas com baixas concentrações de gases na região central do biofilme. Como os microrganismos presentes nestes consórcios são diversificados e podem sofrer alterações fisiológicas gerando comunidades mais complexas, a limitação de oxigênio dentro do biofilme depende do substrato disponível e da concentração deste gás no meio líquido (Kato *et al.*, 1997).

É importante considerar, no entanto, que a disponibilidade limitada de petróleo, devido à baixa solubilidade em meio aquoso, também influencia o processo de biodegradação. Para melhorar a solubilidade do petróleo no meio, muitos microrganismos produzem substâncias conhecidas como biossurfactantes ou substâncias exopoliméricas (EPS) que emulsificam os hidrocarbonetos, aumentam a adesão da célula ao substrato e, conseqüentemente, a sua degradação. Neste contexto, faz-se necessário estudar as características tensoativas destas substâncias.

1.3 BIOSSURFACTANTES

Atualmente a busca por surfactantes naturais, conhecidos como biossurfactantes ou substâncias exopoliméricas (EPS), têm despertado grande interesse para área de biotecnologia, em função da necessidade de preservação ambiental. Estes biopolímeros são produzidos principalmente pelo crescimento aeróbio de microrganismos em meios aquosos a partir da utilização de diferentes substratos como fonte de carbono e energia (Bognolo, 1999) [**Figura 7**, *pág. 19*]. Eles estão sendo amplamente utilizados em substituição aos surfactantes sintéticos derivados de petróleo (Haba *et al.*, 2003), devido às muitas vantagens que apresentam, tais como: aceitabilidade ecológica (Rahman *et al.*, 2002), baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (Costa *et al.*, 2006; Makkar e Cameotra, 2002; Rahman *et al.*, 2002), são efetivos em condições extremas e amplas faixas de temperatura, pH e salinidade (Banat *et al.*, 2000; Mulligan, 2005) e, além disso, são produzidos a partir de fontes renováveis de baixo custo e resíduos industriais (Nitschke *et al.*, 2005).

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, que incluem uma variedade de estruturas químicas tais como glicolipídeos, lipopeptídeos, lipopolissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros (Zajic e Seffens, 1984; Nitschke e Pastore, 2002). A **Tabela 4** mostra as principais classes de biossurfactantes e os microrganismos produtores.

Tabela 4. Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

Classe de biossurfactante	Tipo de biossurfactante	Microrganismos produtores
GLICOLIPÍDEOS	Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Soforolipídeos	<i>Torulopsi bombicola</i> ; <i>Torulopsi apícola</i>
	Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
LIPOPEPTÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
	Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
ÁCIDOS GRAXOS, LIPÍDEOS NEUTROS E FOSFOLIPÍDEOS	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
	Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
	Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
SURFACTANTES POLIMÉRICOS	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Liposan	<i>Cândida lipolytica</i>

Adaptado de Nitschke e Pastore, 2002.

Alguns gêneros destes microrganismos, tais como, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Acinetobacter*, além de serem eficientes produtores de biossurfactantes, são também descritos na literatura como biodegradadores de hidrocarbonetos, e por isso estão sendo amplamente utilizados nas pesquisas sobre biodegradação de petróleo (Cooper & Goldenberg, 1987; Rahman *et al.*, 2003; Calvo *et al.*, 2004; Berthe-Corti & Höpner, 2005).

A porção hidrofóbica dos biossurfactantes pode ser formada por ácidos graxos de cadeia longa, hidroxi-ácidos graxos ou por α -alquil- β -hidroxi-ácidos graxos, e a porção hidrofílica pode ser composta por carboidratos, aminoácidos, peptídeos cíclicos, fosfatos, ácidos carboxílicos ou por álcoois (Cameotra & Makkar, 1998) [Figura 9].

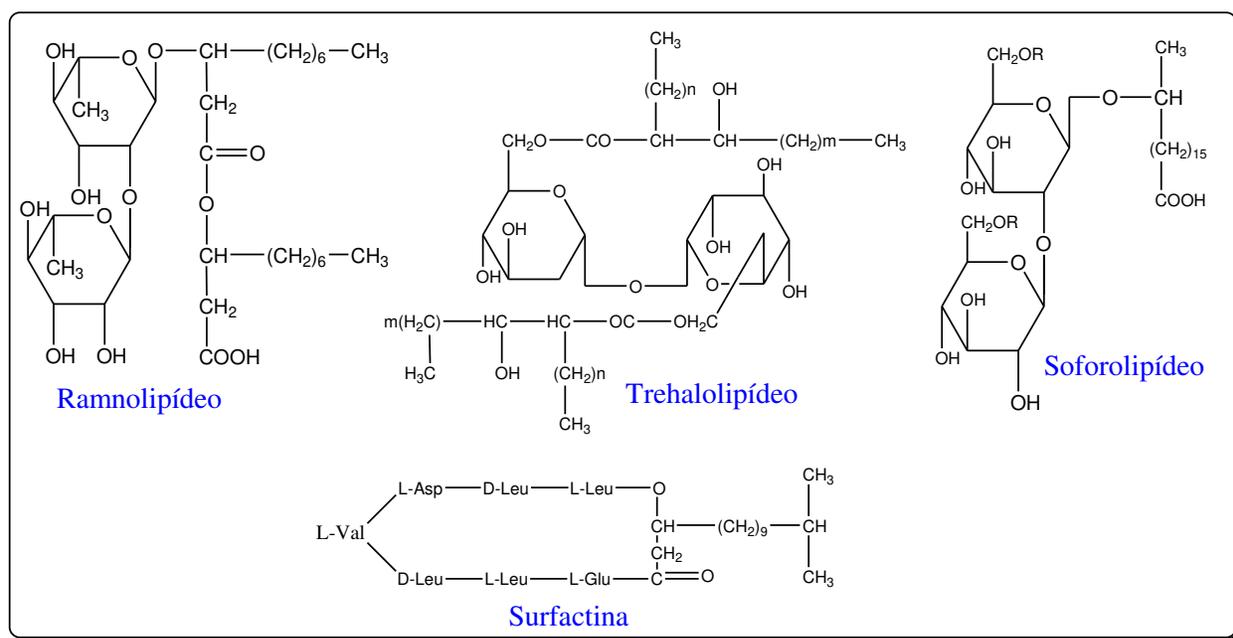


Figura 9. Estrutura química de alguns biossurfactantes (adaptado de Cameotra & Makkar, 1998).

Devido a sua natureza anfipática, os biossurfactantes possuem inúmeras aplicações que envolvem desde a ação de detergência até a solubilização e dispersão de fases entre líquidos imiscíveis (Rahman *et al.*, 2003). Atualmente, a indústria petrolífera é a que mais se beneficia do uso de biossurfactantes em diferentes setores, tais como, em estudos ambientais que envolvem biorremediação e dispersão em caso de derramamentos de óleos, na remoção e mobilização de resíduos de óleos em tanques de estocagem, na incorporação dos biopolímeros em

formulações de óleos lubrificantes ou na recuperação melhorada de petróleo (Mulligan, 2003; Mulligan, 2005).

O uso desses bipolímeros na recuperação de petróleo pode ser efetuado através da introdução dos microrganismos produtores dentro do reservatório com a adição de nutrientes adequados ao seu crescimento (*in situ*) ou pela adição direta do biossurfactante produzido, isolado e purificado em laboratório. Existem sugestões de que microrganismos anaeróbios possam ser injetados conjuntamente ou na ausência de nutrientes em poços para produção *in situ* de biossurfactantes, porém, poucos anaeróbios, tais como, *Bacillus licheniformes*, produzem compostos com propriedades tensoativas (Bognolo, 1999; Ron & Rosenberg, 2002). As moléculas de emulsão, um polissacarídeo compostos por ácidos graxos e proteínas, vêm sendo comercializado para este propósito (Banat, *et al.*, 2000; Dubey & Juwakar, 2001).

A **Tabela 5** apresenta algumas das aplicações atribuídas aos biossurfactantes.

Tabela 5. Algumas aplicações para biossurfactantes

Campos de aplicação	Exemplos de aplicações	Algumas funções do biossurfactante
Petróleo	Recuperação melhorada de petróleo (MEOR) Desemulsificante	Recuperação de óleo residual, redução da viscosidade do óleo Solubilização, desemulsificação de emulsões, redução da viscosidade
Ambiental	Biorremediação	Sequestrante de metais, emulsificação de hidrocarbonetos
Biológico	Microbiologia	Comunicação celular, acesso a nutriente
Cosmético	Produtos de beleza	Emulsionante, solubilizante

Adaptada de Singh *et al.*, (2007).

1.3.1 PROPRIEDADES DOS BISSURFACTANTES

O interesse recente em estudar biossurfactantes se deve a grande diversidade de microrganismos e de diferentes substratos utilizados para sua produção, os quais conferem propriedades e funções específicas que dependem das condições de cultivo e composição do meio de cultura (Banat, 1995; Déziel et al., 2000; Haba, 2003).

As propriedades tensoativas e emulsificantes (ou propriedades surfactantes), utilizadas para medir a eficiência dos biossurfactantes, promovem a emulsificação e solubilização de substratos imiscíveis em água, como os alcanos, tornando-os rapidamente disponível para o metabolismo microbiano (Banat *et al.*, 1991; Mulligan, 2005; Singh 2007).

Os parâmetros mais largamente utilizados para medir as propriedades surfactantes são: tensão superficial (TS) e interfacial (TI), índice de emulsificação (*E*) e concentração micelar crítica (CMC). As tensões superficial e interfacial referem-se ao posicionamento das moléculas nas interfaces ar/água e óleo/água respectivamente, e podem ser medidas facilmente utilizando-se um tensiômetro (Desai e Banat, 1997). A CMC é a concentração mínima de tensoativo necessária para atingir os valores mais baixos de tensão superficial e interfacial, a partir da qual se inicia a formação de micelas (Christofi e Ivshina, 2002; Mulligan 2005). De acordo com Benincasa e colaboradores (2004), concentrações entre 1 a 200 mg/L de biossurfactante são necessárias para se atingir a CMC.

A habilidade que os biossurfactantes têm de emulsificar substratos insolúveis em meio aquoso e estabilizar a emulsão formada está relacionada com a propriedade denominada de índice de emulsificação (*E*) (Crueger & Crueger, 1984; Fiechter, 1992; Tuleva, 2002). Este índice é medido pelo percentual da altura da camada emulsionada dividido pela altura total do líquido (Monteiro *et al.*, 2007).

Monteiro *et al.* (2007) mostrou que culturas puras de *Pseudomonas aeruginosa* foram capazes de formar emulsões com querosene ($E = 67,9\%$) que permaneceram estáveis por 30 dias.

Outra propriedade que os biossurfactantes apresentam é o efeito antibiótico sobre vários microrganismos que competem por alimento no mesmo ambiente. Um microrganismo produtor de biossurfactante tem um crescimento privilegiado sobre os demais (Fiechter, 1992). Atividades antifúngicas e antibacterianas já foram relatadas para diferentes biossurfactantes, especialmente os ramnolipídeos (Benincasa 2004; Haba, 2003, Abalos, 2001).

1.4 ÁREA DE ESTUDO

A Bacia de Campos é a principal província petrolífera brasileira e situa-se em águas territoriais do Estado do Rio de Janeiro cobrindo cerca de 115.800 km², dos quais apenas 5.800 km² são em área emersa. Esta bacia compreende uma faixa de aproximadamente 150 Km de largura, englobando a plataforma continental (Rangel & Martins, 1998). Para o norte, a Bacia é parcialmente isolada da Bacia do Espírito Santo, na região de águas rasas, pelo Alto de Vitória e para o sul, a Bacia de Campos limita-se com o Alto de Cabo Frio. Em águas profundas, não existe uma separação efetiva entre as Bacias de Campos e do Espírito Santo (Mohriak *et al.*, 1995). Sua formação está diretamente relacionada com a abertura do oceano Atlântico, no Cretáceo Inferior e seus óleos apresentam características de óleos lacustres, correlacionando-se aos folhelhos da formação Lagoa Feia (Mello *et al.*, 1988; Guardado *et al.*, 1989; Trindade *et al.*, 1995; Milani *et al.*, 2000) [**Figura 10**].

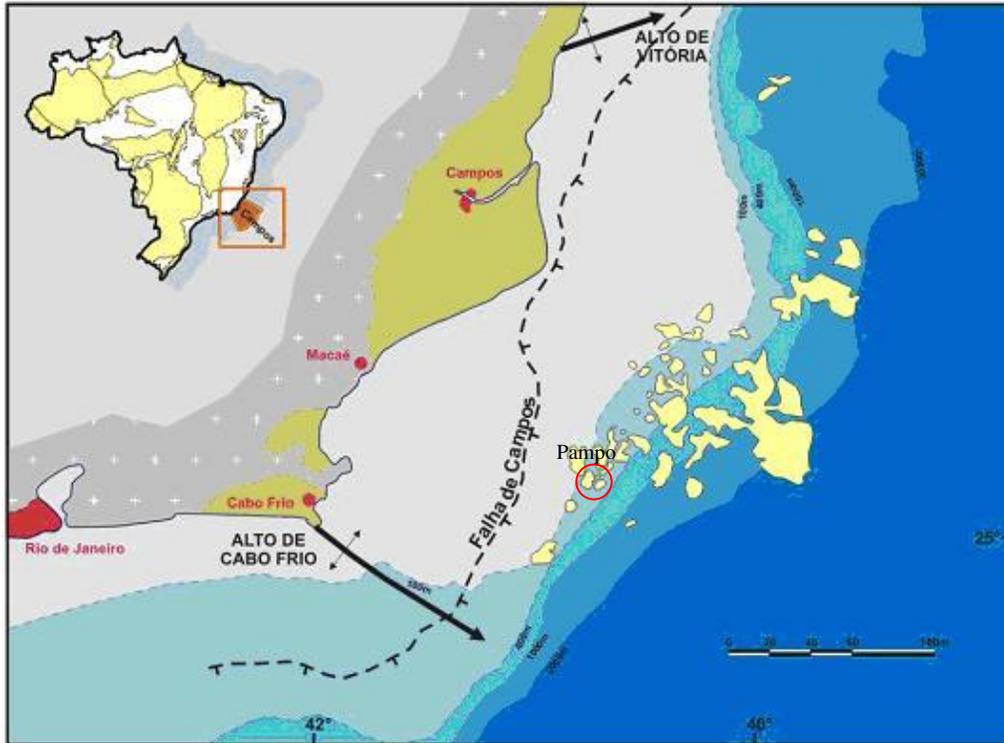


Figura 10. Mapa de localização da Bacia de Campos mostrando seus limites norte (Alto de Vitória) e sul (Alto de Cabo Frio), com destaque ao Campo Pampo Sul (Adaptado de Rangel e Martins, 1998)

A Bacia de Campos possui um único sistema petrolífero ativo eficiente com um número de acumulações de hidrocarbonetos (HCs) bastante elevado (Lopes, 2004). Um sistema petrolífero engloba a rocha geradora ativa, o óleo e o gás gerados e todos os elementos e processos geológicos necessários para a existência de uma acumulação de petróleo (Magoon & Dow, 1994).

Análises geoquímicas realizadas até o momento, indicam que quase todas as acumulações de óleos descobertas nesta Bacia foram geradas pelos folhelhos negros lacustres da Formação Lagoa Feia (Lopes, 2004) e que o teor de carbono orgânico total (COT) médio situa-se entre 2 e 6 % (Guardado *et al.*, 2000).

Com relação à caracterização geoquímica dos óleos, os dados indicam que eles possuem uma única geradora com matéria orgânica do Tipo I (material rico em

lipídeos, principalmente algas e bactérias), depositada em lagos fechados, anóxicos e sem influência de matéria orgânica continental. Mesmo possuindo uma origem comum, os óleos desta bacia apresentam diferentes níveis de maturação e biodegradação (Ferreira, 1993). A intensidade da alteração, seja por biodegradação ou por *water washing* (“lixiviação”), depende do contexto geológico de migração e acumulação que estes óleos sofreram. Alguns fatores contribuíram para este processo, tais como as infiltrações de águas meteóricas nos reservatório da Bacia; temperatura do reservatório durante e após a migração-acumulação; facilidade de movimentação da água na trapa, propiciando a circulação de águas de infiltração; contato óleo-água favorável ao crescimento de microrganismos e distância da migração secundária para reservatórios mais rasos (Pereira *et al.*, 1984)

Os óleos típicos de Campos são na sua maioria biodegradados. Entre as características destes óleos tem-se razões isotópicas $\delta^{13}\text{C}$ variando entre -25,6‰ e -23,0 ‰, alta razão hopano/esterano ($\text{H/S} > 5$) e predominância de C_{27} esteranos. Os óleos que são considerados pesados apresentam $^{\circ}\text{API}$ em torno de 25° e, óleos extremamente biodegradados apresentam valores abaixo de 10° (Guardado *et al.*, 1989). Em óleos não biodegradados ocorre, normalmente distribuição bimodal de alcanos e razão pristano/fitano > 1 (Mello *et al.*, 1988; Mohriak *et al.*, 1989). O índice de acidez está entre 0,1 e 0,3 mg KOH/g nos óleos não biodegradados e chega a atingir 1,5 mg KOH/g na maioria dos óleos biodegradados (Guardado *et al.*, 1989). Os óleos biodegradados ainda preservam muito das características dos precursores dos biomarcadores mais resistentes (como hopanos e esteranos), porém *n*- e isoalcanos são severamente afetados ou estão ausentes. Neste caso é comum o aparecimento de uma mistura complexa não-resolvida.

Devido aos níveis similares de maturidade térmica e dos diferentes graus de biodegradação destes óleos, eles são normalmente utilizados para investigações sobre os processos de biodegradação (Guardado *et al.*, 2000), como demonstrado

neste trabalho. A **Tabela 49** (*parte experimental, seção 4.2, pág.259*) apresenta as características geoquímicas dos óleos utilizados neste estudo.

2.OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esta pesquisa visou investigar os processos e mecanismos de biodegradação em uma amostra de petróleo não biodegradada, como fonte de carbono, bem como estudar o comportamento de consórcios aeróbios, anaeróbios e mistos frente a biodegradação.

Os óleos utilizados neste estudo possuem uma rocha geradora comum com matéria orgânica do Tipo I (material rico em lipídeos, principalmente algas e bactérias), depositada em lagos fechados, anóxicos e sem influência de matéria orgânica continental, além disso possuem níveis similares de maturidade térmica e diferentes graus de biodegradação. Todas as amostras foram coletadas sob condições adequadas de assepsia necessárias para esta investigação.

Dentro deste contexto, estabeleceu-se algumas etapas de trabalho para demonstrar como os microrganismos atuam no processo de biodegradação do petróleo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I)** Obter consórcios microbianos a partir de amostras de água de formação e de petróleo do Campo Pampo Sul, Bacia de Campos (RJ), através de enriquecimentos sob condições aeróbias e anaeróbias;
- II)** Verificar o potencial de oxidação dos consórcios obtidos utilizando hidrolases (epóxido-hidrolases, esterases e lipases) e monooxigenases;
- III)** Avaliar a atividade biodegradadora de consórcios aeróbios e anaeróbios utilizando o petróleo adsorvido ou não em diferentes matrizes;

- IV)** Investigar a ação de consórcios mistos no processo de biodegradação do petróleo;
- V)** Avaliar a produção e composição de substâncias exopoliméricas (EPS) produzidas pelo consórcio aeróbio;
- VI)** Caracterizar os EPS através de inserção direta utilizando espectrometria de massas com ionização por eletrospray (MS-ESI).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CAPÍTULO 1 – MICROBIOTA AERÓBIA E ANAERÓBIA DE PETRÓLEO E ÁGUA DE FORMAÇÃO

Este primeiro capítulo refere-se à caracterização dos consórcios microbianos e investigação das suas atividades enzimáticas.

3.1.1 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSÓRCIOS

Um grande número de microrganismos aeróbios, anaeróbios estritos e facultativos, com diferentes capacidades metabólicas, são frequentemente isolados a partir de amostras de água de formação e de petróleo (Magot *et al.*, 2000).

Utilizando técnicas de enriquecimentos (*parte experimental, seção 4.4, pág.257*), foi possível a recuperação de dois consórcios aeróbios, um anaeróbio e dois consórcios mistos obtidos a partir das amostras de água de formação e petróleo em estudo. Os consórcios aeróbios foram denominados de Co1 e Co2, o anaeróbio de AN e os consórcios mistos de Co1AN e Co2AN.

A partir dos consórcios aeróbios isolou-se algumas bactérias que estão envolvidas nos processos de biodegradação do petróleo. Os resultados obtidos com os isolados do consórcio Co1 foram discutidos por Vasconcelos (2005) e, portanto, trataremos das discussões relativas apenas aos isolados do consórcio Co2. Então, através dos enriquecimentos realizados para a recuperação dos microrganismos presentes nas amostras da coleta 2, conseguiu-se, após técnicas de esgotamento em placas de Petri (*parte experimental, seção 4.4.1, pág. 263*), recuperar 58 linhagens bacterianas macroscopicamente distintas. Os microrganismos isolados foram identificados sob supervisão e responsabilidade da Profa. Dra. Valéria M. de

Oliveira do CPQBA através de técnicas moleculares baseadas em DNAr 16S [Tabela 6].

Tabela 6. Bactérias isoladas e identificadas a partir das amostras da coleta 2.

Isolados	Identificação	Origem
SG01	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG02	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG03	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG04	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG05	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG06	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG07	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG08	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG09	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG10	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG11	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG12(1)	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG12(2)	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG13	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG14	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG15*	<i>Bacillus thuringiensis</i> ou <i>Bacillus cereus</i>	Óleo
SG16	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG18	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG20*	<i>Bacillus thuringiensis</i> ou <i>Bacillus cereus</i>	Óleo
SG21*	<i>Bacillus thuringiensis</i> ou <i>Bacillus cereus</i>	Óleo
SG23(2)	<i>Bacillus simplex</i>	Óleo
SG24	<i>Bacillus sphaericus</i>	Óleo
SG25	<i>Bacillus sphaericus</i>	Óleo
SG26	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG27	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG28	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação

SG29	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG30	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG31	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG32	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG33	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG34	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG35	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG36	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG40	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Óleo
SG41(1)	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG41(2)	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG42(1)	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG43(1)	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG43(2)	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG46	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG47(1)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Óleo
SG47(2)	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG49	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG50	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG51(1)	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG51(2)	<i>Bacillus pumilus</i>	Óleo
SG52*	<i>Staphylococcus warner ou Staphylococcus pasteurii</i>	Óleo
SG54(1)	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG54(2)	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG55	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG56	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG57	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG58(1)	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG58(2)	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG59	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Óleo
SG61	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação
SG62	<i>Bacillus pumilus</i>	Água de formação

*Falta estudo complementar para definir a espécie

De acordo com Orphan *et al.*, (2000), apenas 1 % dos microrganismos presentes nos ambientes naturais podem ser cultivados utilizando-se condições laboratoriais. Baseado nisto, o consórcio aeróbio Co1, anaeróbio AN e o misto Co1AN foram caracterizados através de técnicas moleculares independentes de cultivo (extração do DNA total) realizado pelo grupo da Profa Valéria Maia de Oliveira (CPQBA/UNICAMP).

A partir de bibliotecas obtidas do consórcio aeróbio Co1 foram avaliados 100 clones. A análise das seqüências parciais de DNAr 16S obtidas, através da comparação com seqüências de organismos já identificados e depositados em bases de dados, revelou a presença de bactérias dos gêneros *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium* e *Mezorhizobium*, dentre os clones provenientes deste consórcio [Figura 11A]. A mesma análise realizada para o consórcio anaeróbio revelou que os microrganismos são pertencentes apenas aos gêneros *Bacillus* (89 %) e *Acinetobacter* (11 %) [Figura 11B]. Para o consórcio misto, a análise dos clones revelou a presença de *Brevibacterium*, *Achromobacter* e *Bacillus* também presentes nos consórcios aeróbio e anaeróbio, além de 50 % de bactérias do gênero *Stenotrophomonas* e 6 % de *Rhizobium* [Figura 11C].

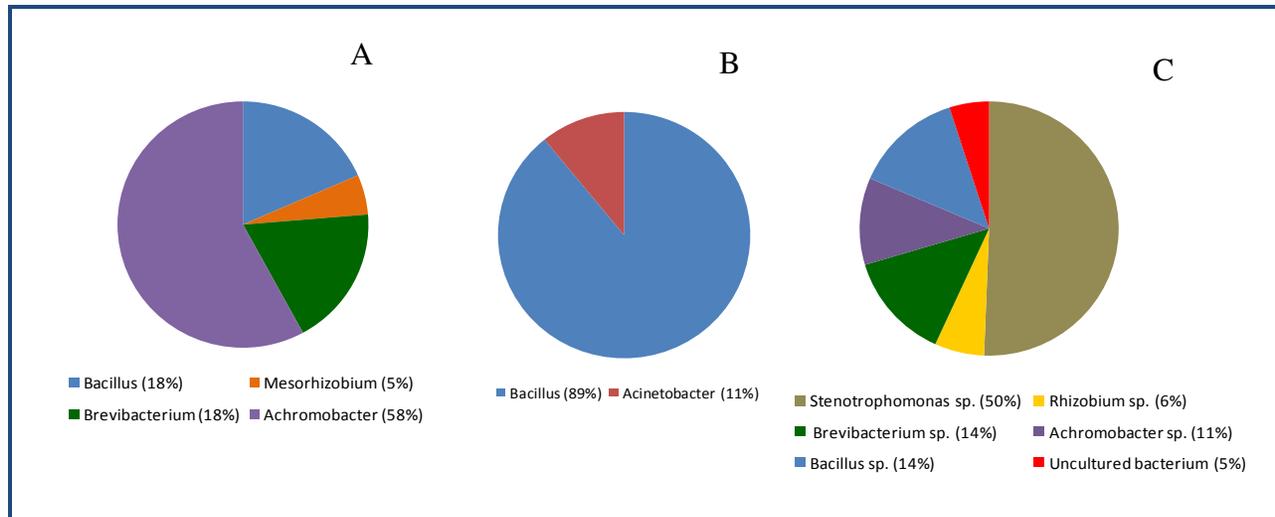


Figura 11. Bactérias presentes no consórcio aeróbio Co1 (A), anaeróbio AN (B) e misto Co1AN (C) após 60 e 180 dias de inoculação, respectivamente. O gênero mais abundante no consórcio aeróbio foi *Achromobacter*, no anaeróbio foi *Bacillus* e no misto foi *Stenotrophomonas*.

Percebe-se que as bactérias aeróbias do gênero *Bacillus* foram as predominantes nos isolados e no consórcio anaeróbio, além de estar presente em menor proporção nos consórcios aeróbio e misto. Uma das possíveis justificativas para este fato é que as bactérias pertencentes a este gênero são potenciais produtores de biossurfactantes (Quesada *et al.*, 1993). Estas substâncias além de ajudarem na emulsificação do petróleo, podem apresentar efeito antibiótico sobre vários microrganismos que competem por alimento no mesmo ambiente e, por isso, um microrganismo produtor de biossurfactante tem um crescimento privilegiado sobre os demais (Fiechter, 1992). A presença deste gênero nos enriquecimentos aeróbios também foi relatada por Vasconcellos (2005), o que torna relevante considerar a habilidade que estes microrganismos possuem em sobreviver em ambientes extremos, com alta salinidade, elevadas temperaturas e pressões e com escassez de nutrientes, como os reservatórios de petróleo.

Algumas bactérias deste gênero são conhecidas por sua capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono diretamente (Toledo *et al.*, 2006)

ou por utilizarem os metabólitos produzidos por outras bactérias, quando estão em consórcios (DuTeau *et al.*, 1998).

As bactérias *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus pasteurii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus simplex*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* e *Achromobacter xylosoxidans* são descritas na literatura como degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) em estudos de biorremediação, sendo que os gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Achromobacter* degradam preferencialmente naftaleno e as que pertencem ao gênero *Stenotrophomonas* são descritas como degradadoras de HPAs de alto peso molecular (fluoranteno, pireno, criseno e antraceno) (Samanta, *et al.*, 2002; Bento, *et al.*, 2003; Said, *et al.*, 2008).

Todas as bactérias identificadas tanto nos isolados quanto nos consórcios são descritas na literatura como degradadoras de hidrocarbonetos e/ou associadas a ambientes contaminados com óleo (Bieszkiewicz *et al.*, 1998 Orphan *et al.*, 2000; Chaillan *et al.*, 2004; Pineda-Flores *et al.*, 2004). O gênero *Achromobacter*, presente em maior abundância no consórcio aeróbio, foi filogeneticamente identificado como *Achromobacter xylosoxidans* e *Achromobacter denitrificans*, enquanto que os clones de *Bacillus* obtidos nos três consórcios foram identificados como *Bacillus sporothermodurans*, principalmente (Pettersen *et al.*, 1996).

Algumas bactérias do gênero *Bacillus* compartilham características morfo-fisiológicas com um grupo de bactérias redutoras de sulfato (BRS) representado principalmente pelo gênero *Desulfotomaculum*. Estas bactérias são descritas na literatura como sendo Gram-positivas e capazes de produzir endosporos resistentes ao calor (Pettersen *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 2000).

Outros trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa (Vasconcellos, 2005) também havia isolado espécies de *Bacillus* em amostras de petróleos a partir de enriquecimentos aeróbios, porém estas espécies ainda não haviam sido

identificadas em consórcios anaeróbios. A predominância de *Bacillus* spp. nos consórcios anaeróbios pode ser explicada pelo fato de que algumas espécies deste gênero são anaeróbios facultativos e por isso são capazes de respirar em ambientes que apresentam condições óxicas e/ou anóxicas. Além disso, estas bactérias podem ser responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos sob condições anaeróbias pelo uso de sulfatos, presente no meio, como acceptor de elétrons, via redução desassimilatória de sulfato (Thauer *et al.*, 1977; Oude Elferink *et al.*, 1994).

Não se observou a presença de nenhum anaeróbio estrito como metanogênicas e BRS, possivelmente devido à baixa ocorrência destas espécies nestes consórcios, dificultando sua identificação. A análise de gases produzidos pelos anaeróbios e consórcios mistos, revelou a presença de acetato e CO₂ em 120 dias de incubação. Após este período todo o acetato produzido pelas acetogênicas a partir da biodegradação de HCs [**Figura 5**, *introdução, seção 1.2, pág. 9*] é convertido a CO₂, um dos produtos de biodegradação das metanogênicas. No entanto, a ausência de metano mesmo após 270 dias, é um indicativo da ausência destas bactérias em ambos os consórcios [**Figura 12**].

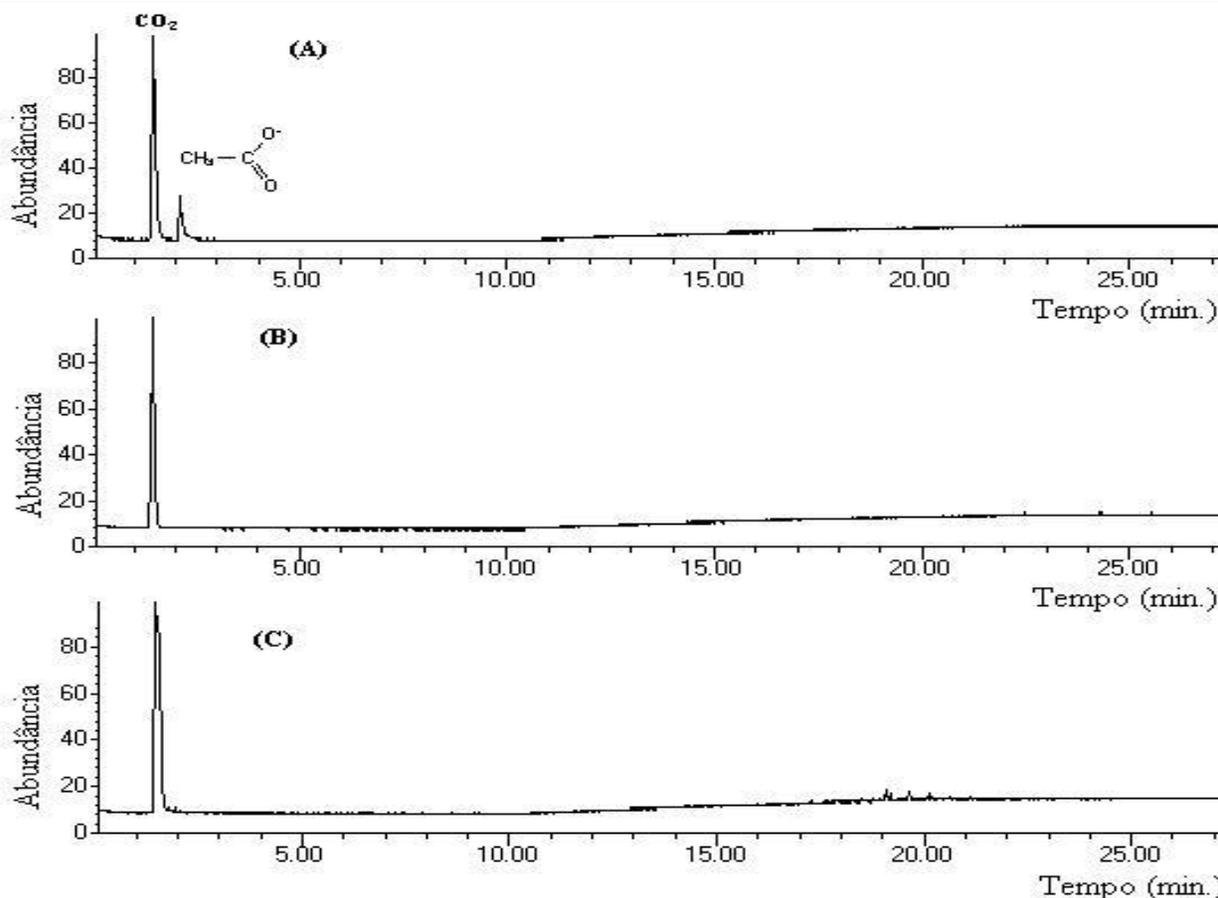


Figura 12. CG-EM de amostras de gases produzidos pelos consórcios anaeróbios e mistos após (A) 120 dias, (B) 180 dias e (C) 270 dias. Após 120 dias todo o acetato é convertido a CO₂.

A presença de BRS abaixo do limite de detecção não era esperada, pois na análise dos gases para anaeróbios e mistos, observou-se a formação de acetato após 120 dias que é um dos produtos de oxidação de BRS principalmente pertencentes ao gênero *Desulfotomaculum* quando se utiliza aminas e/ou nicotinatos como doadores de elétrons (Castro *et al.*, 2000) (presentes na composição da solução de vitaminas para BRS, *parte experimental, seção 4.3, pág. 260*) e, além disso, as amostras analisadas possuíam um forte odor de ácido sulfídrico (H₂S), que é um dos produtos do metabolismo de BRS no processo denominado de redução desassimilatória de sulfato (Castro *et al.*, 2000).

Como todas as bactérias avaliadas neste trabalho são descritas como biodegradadoras de HCs, fez-se necessário investigar se elas possuem enzimas que caracterizam as atividades envolvidas no processo de biodegradação do petróleo.

3.1.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Informações sobre o perfil enzimático de comunidades microbianas são importantes para se obter um melhor entendimento sobre suas preferências metabólicas.

Enzimas que promovem oxidações, incluindo hidroxilações alifáticas e aromáticas, di-hidroxilações, oxidações de Baeyer-Villiger, oxidações de heteroátomos, oxidações de cetonas, epoxidações de alquenos, dentre outras, são de grande valor na área de biotecnologia (Kamembeek, *et al.*, 2003) e, além disso, estão envolvidas nos processos de biodegradação do petróleo [**Figura 3**, *introdução, seção 1.2, pág 7*].

As monooxigenases (mono e dioxigenases) são enzimas dependentes de cofatores e promovem oxidações específicas de hidrocarbonetos através da inserção de um ou mais oxigênios no substrato (Shilov and Shul'pin, 1997). Dentre estas, destacam-se as Baeyer-Villigerases que são encontradas na biossíntese de muitos produtos naturais, como por exemplo, na síntese de esteróides em plantas (Mihovilovic *et al.*, 2002) e que também participam das vias catabólicas de cetonas utilizadas como fontes de carbono e energia, tais como: metilcetonas alifáticas, hidrocarbonetos alicíclicos, compostos aromáticos e terpenos. Além disso, existem relatos da participação de oxidação de Baeyer-Villiger em rotas de degradação microbiana (Walton & Stewart, 2002).

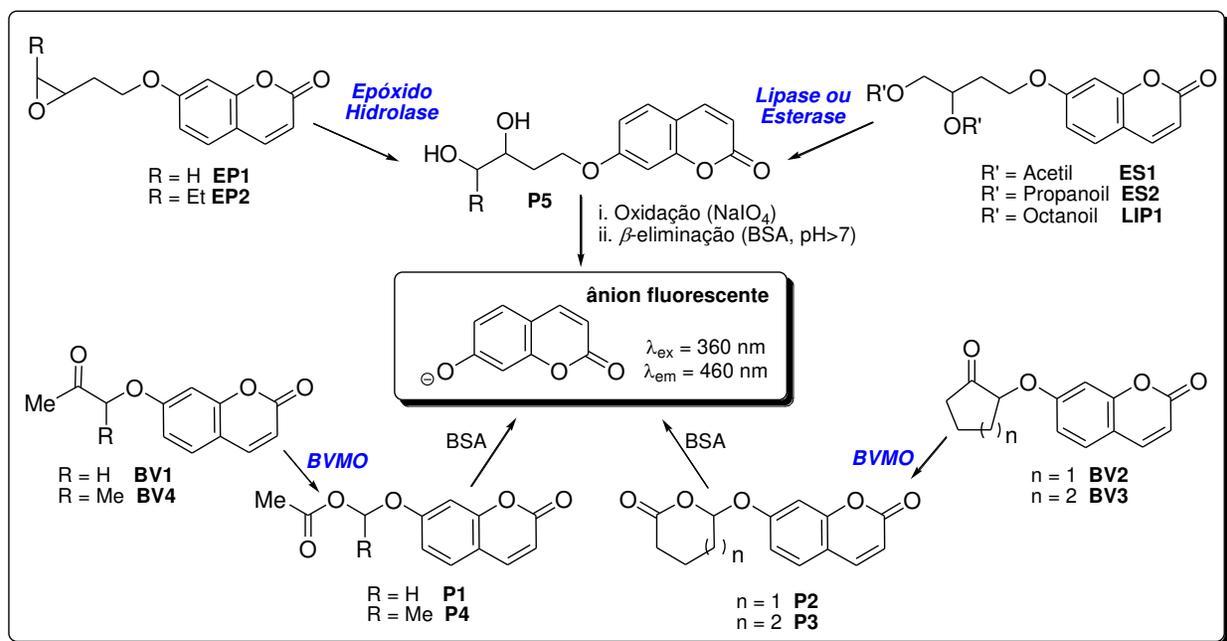
As hidrolases (epóxido-hidrolases, esterases e lipases) estão entre as enzimas mais importantes em termos de aplicações industriais, uma vez que elas são

utilizadas com diferentes condições reacionais, sem a presença de cofator e com uma variedade de substratos.

Em geral, as epóxido-hidrolases convertem epóxidos em dióis vicinais pela adição regio- e estereoespecífica de uma molécula de água, transformando os substratos em produtos mais solúveis e menos tóxicos. (Mischitz & Faber, 1996; Weijers & Bont, 1998). Enquanto as esterases e lipases catalisam reações de hidrólise, esterificação e transesterificação de triglicerídeos formados por ácidos graxos de cadeia curta ($< C_6$), tais como acetatos e propionatos e ácidos graxos de cadeia longa ($> C_8$), tais como octanoatos, respectivamente (Bornscheuer, 2002).

Baseado neste contexto resolveu-se investigar a presença das monooxigenases e hidrolases nas bactérias isoladas e nos consórcios obtidos a partir das amostras de petróleo e de água de formação utilizadas neste estudo. Para investigar a presença destas enzimas envolvidas nos processos de biodegradação do petróleo usou-se técnicas de triagem de alto desempenho (HTS) baseadas na emissão de fluorescência, devido à alta velocidade de reação e simplicidade do ensaio (Wahler and Reymond, 2001).

A triagem foi realizada em microplacas onde se monitorou a intensidade de fluorescência, a qual está associada à biotransformação do substrato que é detectada pela liberação do ânion 7-hidroxycumarina [**Esquema 1**].



Esquema 1. Representação esquemática dos substratos fluorescentes utilizados na detecção de Baeyer-Villiger monooxigenases, epóxido-hidrolases, esterases e lipases.

Os dados da intensidade de fluorescência obtidos nas triagens, tanto para monooxigenases como para hidrolases, foram convertidos em concentração utilizando-se a curva de calibração da umbeliferona (*parte experimental, seção 4.9.4, pág. 297*). Assim, considerou-se como atividades enzimáticas positivas as reações que apresentaram conversão do substrato maior ou igual a 5 % (~ 110 unidades de fluorescência).

A triagem das 58 bactérias isoladas a partir da coleta 2, revelou que 18 apresentaram atividade enzimática para monooxigenases, transformando cetonas em ésteres, e 13 apresentaram atividades hidrolíticas (epóxido-hidrolases, esterases e lipases), além dos consórcios 1 e 2 (Co1 e Co2) que também apresentaram estas atividades para as enzimas analisadas.

As bactérias que compõem o consórcio 1 (Co1) metabolizaram os substratos BV1 e BV2, com uma leve predominância de BV2, biotransformando

ciclopentanonas em δ -lactonas, revelando a presença de CPMO (ciclopentanona monooxigenases). Por outro lado, as bactérias isoladas e o Co₂ apresentaram maior seletividade, uma vez que metabolizaram preferencialmente o substrato BV1, indicando uma clara habilidade para transformar cetonas de cadeia aberta em ésteres. As bactérias *Bacillus pumilus* SG 32, 42(1), 51(2), 54(1), 54(2), 56 e 58(2) só apresentaram atividades após pré-incubação das placas durante 24 h sem adição de BSA. A **Tabela 7** apresenta os resultados de conversão para as bactérias e consórcios que foram mais ativos para detecção de monooxigenases.

Tabela 7. Ensaio enzimático para detecção de monooxigenases em bactérias isoladas e consórcios aeróbios a partir de amostras de petróleo

Microrganismos	Conversão (%) ^a			
	BV1	BV2	BV3	BV4
<i>Bacillus pumilus</i> SG01	34	0.8	0.1	1
<i>Bacillus pumilus</i> SG02	16	2	0.2	2
<i>Bacillus pumilus</i> SG03	18	1	0.04	2
<i>Bacillus pumilus</i> SG06	37	1	0.4	2
<i>Bacillus pumilus</i> SG32 ^b	5	6	1	2
<i>Bacillus pumilus</i> SG34	23	0.2	0.5	1
<i>Bacillus pumilus</i> SG35	33	0.4	0.4	0.3
<i>Bacillus pumilus</i> SG41(1)	34	0.5	0.04	0.3
<i>Bacillus pumilus</i> SG42(1) ^b	7	1	2	1
<i>Bacillus pumilus</i> SG49	37	0.6	0.1	1
<i>Bacillus pumilus</i> SG50	20	0.7	0.2	1
<i>Bacillus pumilus</i> SG51	35	0.5	1	0.7
<i>Bacillus pumilus</i> SG51(2) ^b	8	0.5	1	3

<i>Bacillus pumilus</i> SG54(1) ^b	6	0.6	0.5	3
<i>Bacillus pumilus</i> SG54(2) ^b	14	8	2	4
<i>Bacillus pumilus</i> SG56 ^b	10	0.5	1	4
<i>Bacillus pumilus</i> SG58(2) ^b	11	3	2	1
<i>Bacillus pumilus</i> SG61	25	0.6	0.3	0.6
Co1	5	6	0.2	1.2
Co2	8	3	0.5	2

^aConversão calculada a partir da curva de calibração da umbeliferona;

^bCom pré-incubação dos substratos a 28 °C por 24 h.

De forma análoga aos ensaios para monooxigenases (*parte experimental, seção 4.9.3.1, pág. 295*), realizou-se uma série de experimentos para detecção de atividades hidrolíticas (epóxido-hidrolases, esterases e lipases) de acordo com o procedimento detalhado na parte experimental (*parte experimental, seção 4.9.3.2, pág. 296*). Os resultados estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Ensaios enzimáticos para detecção de hidrolases em bactérias isoladas e consórcios aeróbios a partir de amostras de petróleo

Microrganismos	Conversão (%) ^a				
	EP1	EP2	ES1	ES2	LIP1
<i>Bacillus pumilus</i> SG4	2	6	2	7	75
<i>Bacillus pumilus</i> SG10	2	7	0.5	2	17
<i>Bacillus pumilus</i> SG12	2	6	2	3	46
<i>Bacillus pumilus</i> SG13	1	6	3	18	51
<i>Bacillus pumilus</i> SG16	0.6	7	0.3	1	11
<i>Bacillus pumilus</i> SG26	0.4	2	1	5	77
<i>Bacillus pumilus</i> SG27	0.5	5	3	17	81

<i>Bacillus pumilus</i> SG29	3	9	0.6	3	35
<i>Bacillus pumilus</i> SG30	2	8	1	7	6
<i>Bacillus pumilus</i> SG42(1)	2	5	0.9	2	1
<i>Bacillus pumilus</i> SG43(1)	3	7	1	3	2
<i>Bacillus pumilus</i> SG54(1)	3	5	0.8	1	1
<i>Bacillus pumilus</i> SG56	2	7	0.3	2	0.2
Co1	5	5	7	4	5
Co2	4	5	6	4	4

^aConversão calculada a partir da curva de calibração da umbeliferona.

De acordo com a seletividade enzimática na hidrólise dos epóxidos EP1 e EP2 observado na **Tabela 8**, os microrganismos isolados e o Co2 foram seletivos para a sonda EP1 (epóxido terminal) e os microrganismos do Co1 foram ativos para as duas sondas, por isso não foram seletivos.

Quanto à atividade detectada para esterases e lipases, observou-se que as bactérias isoladas *Bacillus pumilus* SG 04, 13, 26, 27 e 30 hidrolisaram os ésteres propionato (ES2) e octanoato (LIP1) [**Esquema 1**, pág.48], enquanto as bactérias *Bacillus pumilus* SG 10, 12(1), 16 e 29 hidrolisaram seletivamente o éster de cadeia mais longa, LIP1. Nenhum dos isolados apresentou atividade significativa para o éster de cadeia mais curta (acetato, ES1), porém ambos os consórcios mostraram esta atividade.

Os resultados obtidos na triagem de monooxigenases e hidrolases podem ser comparados ao que foi visto na rota de biodegradação do petróleo pelos microrganismos aeróbios [**Figura 3**, introdução, seção 1.2, pág. 7], através dos passos enzimáticos seqüenciais: primeiro, a cetona é transformada em lactona ou éster pela ação de uma enzima ou microrganismo com atividade monooxigenase e, em seguida, ocorre a abertura da lactona ou hidrólise do éster pela ação de uma

esterase que é adicionada ao meio reacional. A reação positiva é identificada pela redução do pH da mistura reacional pela formação de ácidos. Assim constatou-se que a presença destas enzimas tanto nos consórcios, quanto nos isolados, é uma evidência de que estes microrganismos realmente possuem capacidade metabólica para biodegradar hidrocarbonetos.

Para validar os resultados positivos obtidos nos ensaios de triagem foi necessário utilizar substratos reais em metodologias de multibioreações.

3.1.3 MULTIBIOREACÕES

A metodologia de multibioreações é aplicada quando se deseja monitorar uma reação biocatalítica de um microrganismo com vários substratos num mesmo pote reacional (Gonçalves, 2004).

As multibioreações foram realizadas para todas as bactérias isoladas que apresentaram resultados positivos nos ensaios de triagem, para os consórcios e para os microrganismos *Brevibacillus* sp., *Dietzia* sp., *Methylobacterium* sp., *Bacillus pumilus* 6 e *Pseudomonas stutzeri* isolados da coleta 1.

Os microrganismos foram avaliados com o objetivo de monitorar simultaneamente reduções, oxidações e/ou hidrólises dos substratos cânfora [1], *cis*-jasmona [2], 2-metil-ciclohexanona [3], 1,2-epoxioctano [4], acetato [5], propionato [6] e octanoato [7] de feniletila [Figura 13].

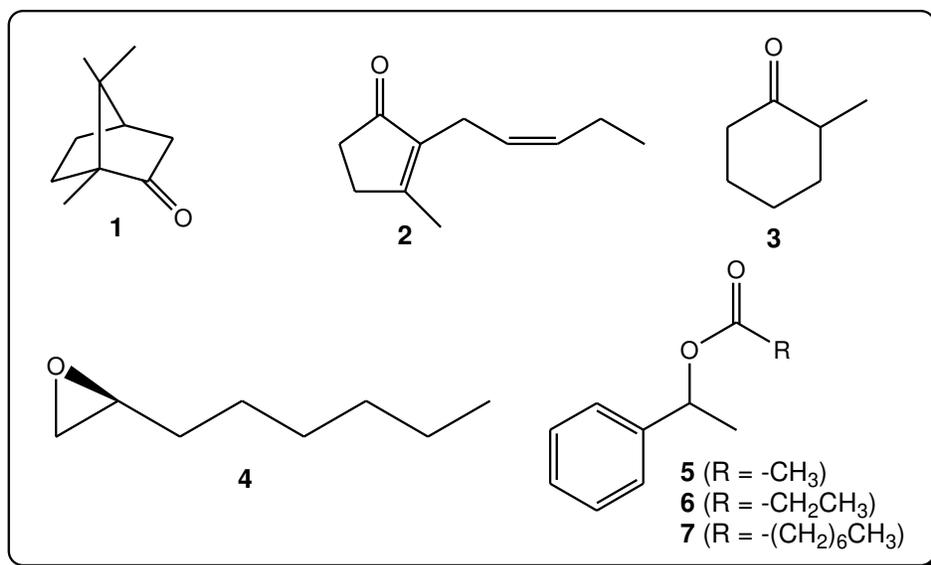


Figura 13. Substratos usados nas multibioreações.

Para validar os ensaios de Baeyer-Villiger monooxigenases (BVMO), inicialmente usou-se [1] e [2] como substratos reacionais [Figura 14].

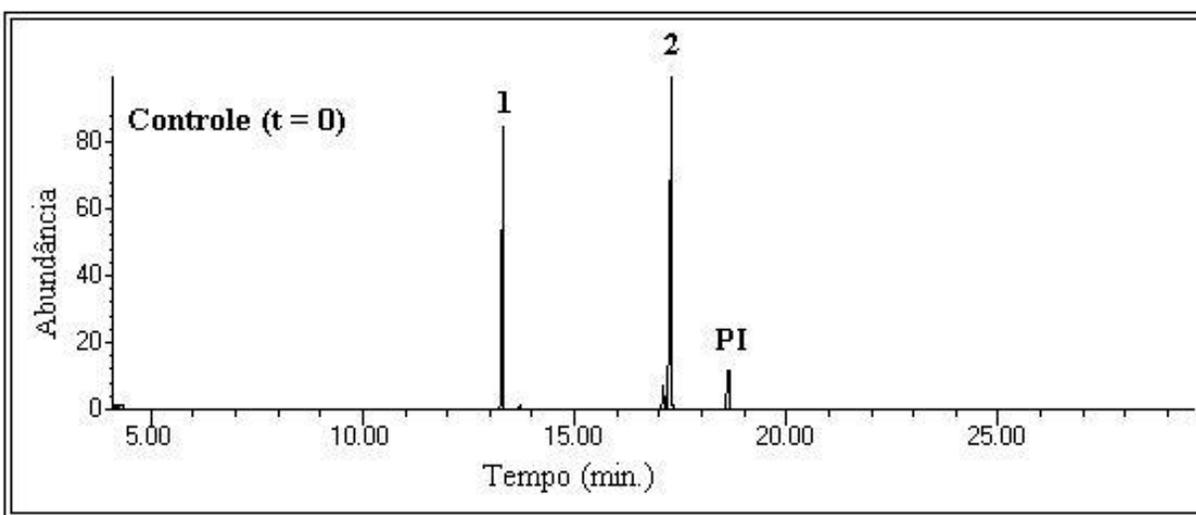


Figura 14. Cromatograma de íons (CG-EM) de cânfora [1] e *cis*-jasmona [2] utilizados nas multibioreações. PI = Padrão Interno (Pentadecano, 0,02 mg/mL).

Os espectros de massas para cânfora e *cis*-jasmona estão representados na [Figura 15].

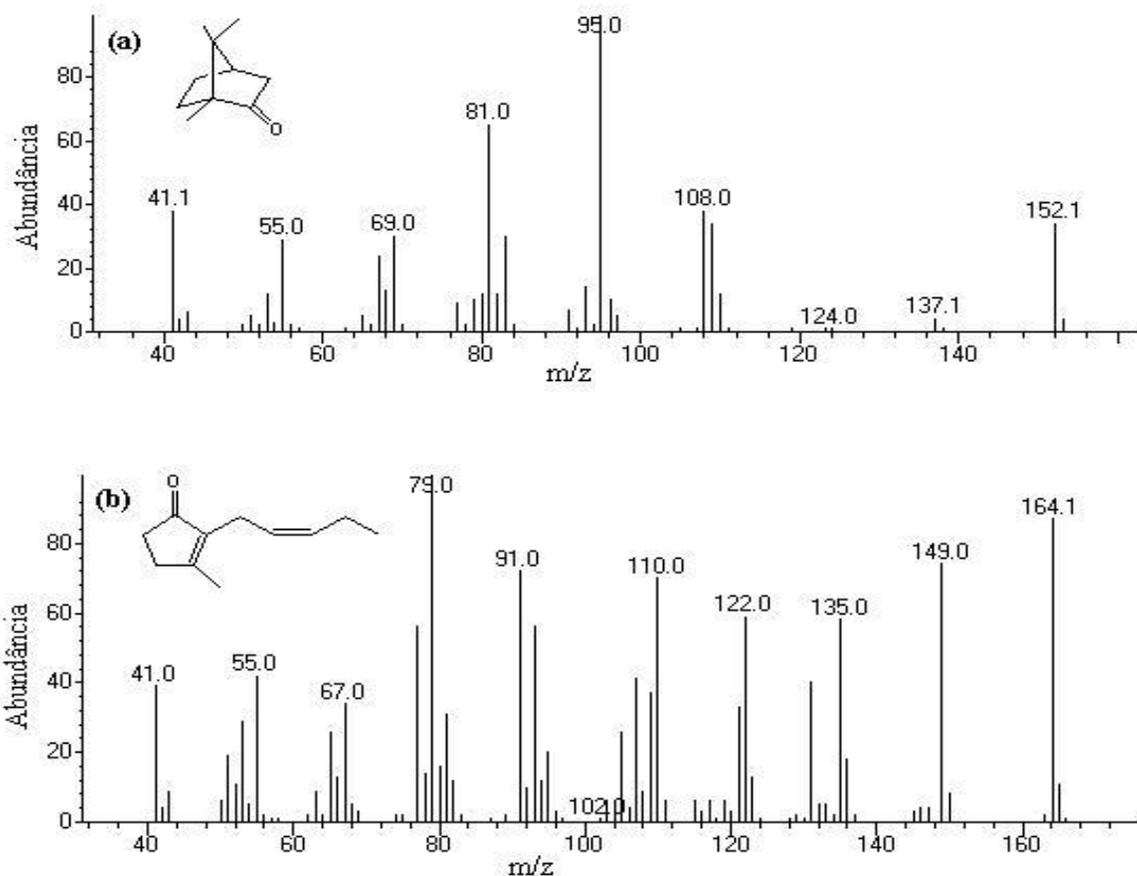


Figura 15. Espectros de massas dos substratos (a) cânfora e (b) *cis*-jasmona.

Os microrganismos *Brevibacillus* sp., *Dietzia* sp. e *Methylobacterium* sp., *Bacillus pumilus* SG 01, 06, 49 e 51(2), bem como os consórcios Co1 e Co2, reduziram a cânfora (**1**) para seu correspondente álcool, borneol (**1a**), mostrando atividade oxidorrredutase. É importante destacar que a hidroxilação microbiológica de cânfora é relatada para várias espécies de microrganismos e está associada a uma atividade de enzimas monooxigenases do tipo P450 (Orihara *et al.*, 1994). Estes mesmos microrganismos oxidaram a *cis*-jasmona (**2**) para 7,8-epoxijasmona (**2a**), sugerindo a presença de uma alceno monooxigenase, e para 4-hidroxijasmona (**2b**), 7-hidroxijasmona (**2c**) e 7,8-diidroxijasmona (**2d**). A **Figura 16** mostra o

cromatograma que ilustra estes resultados para *Bacillus pumilus* SG01 após 168 h de incubação, representativo para os microrganismos isolados e a **Figura 17** apresenta o cromatograma para o Co1, representativo dos dois consórcios avaliados.

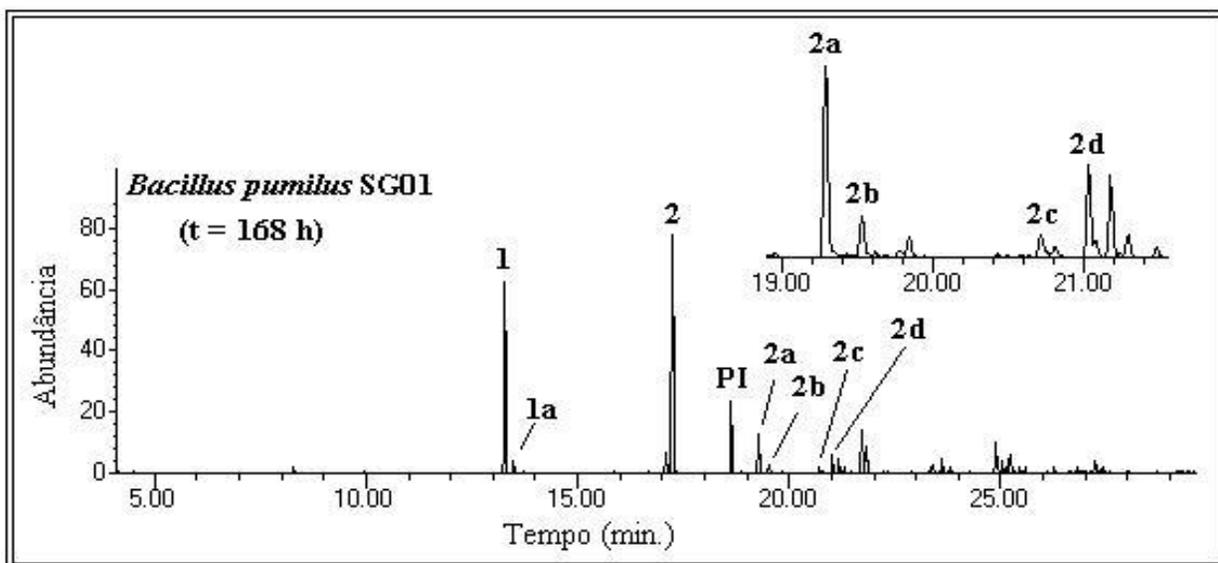


Figura 16. Cromatograma de íons (CG-EM) obtido após 168 h de reação com *Bacillus pumilus* SG01 utilizando cânfora e *cis*-jasmona.

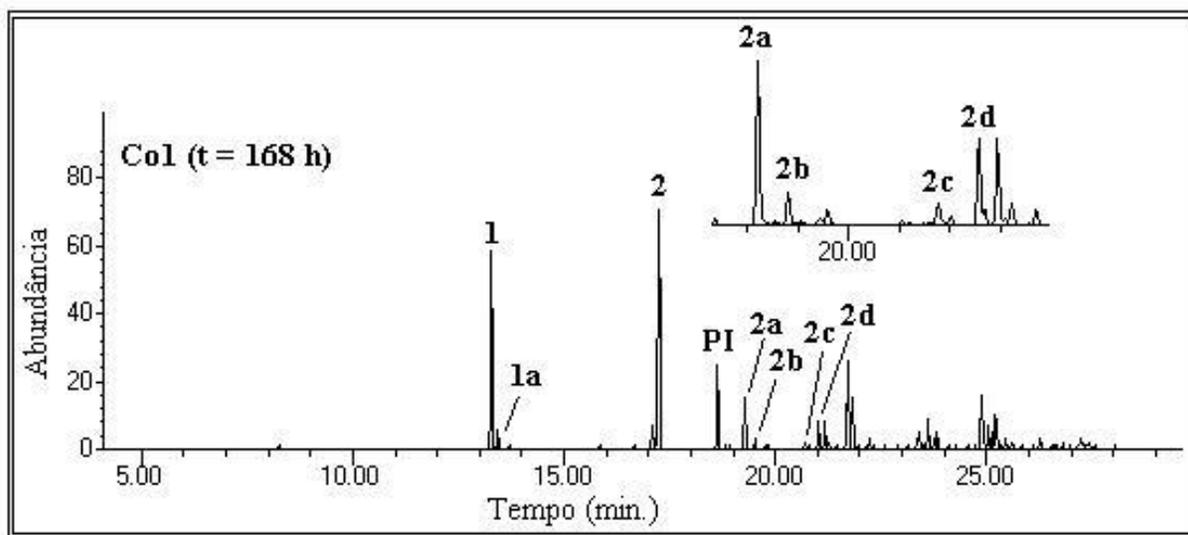
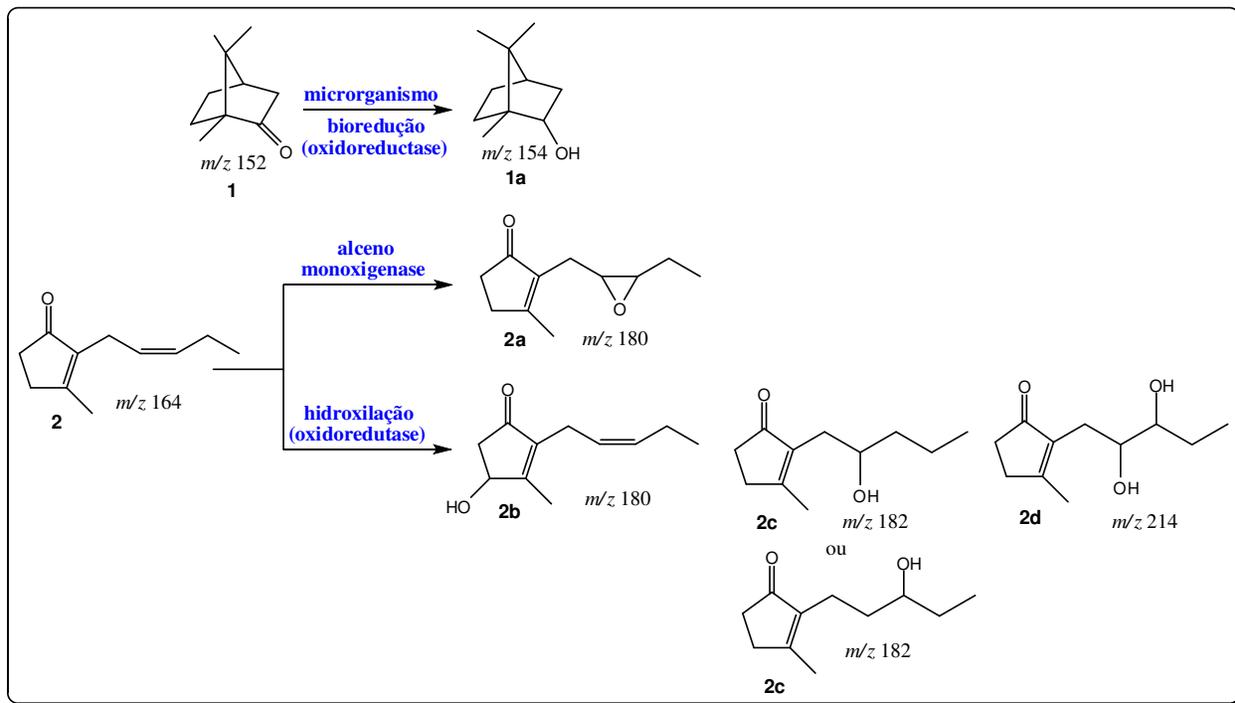


Figura 17. Cromatograma de íons (CG-EM) obtido após 168 h de reação com Co1 utilizando cânfora e *cis*-jasmona.

O **Esquema 2** apresenta as biotransformações ocorridas e as enzimas envolvidas nesta primeira multibioreação com cânfora e *cis*-jasmona. E a **Tabela 9** apresenta as conversões obtidas por CG-EM para os produtos obtidos.



Esquema 2. Biotransformações ocorridas e enzimas detectadas na multibioreação com cânfora e *cis*-jasmona.

Tabela 9. Conversões (%) obtidas por CG-EM para os produtos obtidos na multibioreação com cânfora e *cis*-jasmona

Microrganismos	Tempo (h)	1a (%)	2a	2b	2c	2d
<i>Brevibacillus</i> sp. 1	240	nd ^a	3	nd	1	4
<i>Dietzia</i> sp. 1	48	3	3	4	nd	9
<i>Methylobacterium</i> sp. 1	240	15	3	2	nd	3
Co1	168	1	16	4	2	8
<i>Bacillus pumilus</i> SG01	168	2	13	3	2	7
<i>Bacillus pumilus</i> SG06	240	7	8	5	nd	34
<i>Bacillus pumilus</i> SG49	240	10	9	10	nd	75
<i>Bacillus pumilus</i> SG51(1)	240	4	1	2	nd	7
Co2	240	1	2	1	nd	2

^and = não detectado

Os produtos **2a-2d** também foram detectados por Pinheiro (2006) em bioconversões com microrganismos de coleções de culturas brasileira. Neste trabalho, utilizou-se os padrões obtidos sinteticamente por Pinheiro (2006), para confirmar através de coinjeção os produtos detectados nesta primeira multibioreação. O álcool borneol (**1a**), gerado a partir da bio-redução da cânfora, foi confirmado por coinjeção do padrão obtido da *Sigma-Aldrich*.

As **Figuras 18 e 19** apresentam os cromatogramas com as coinjeções.

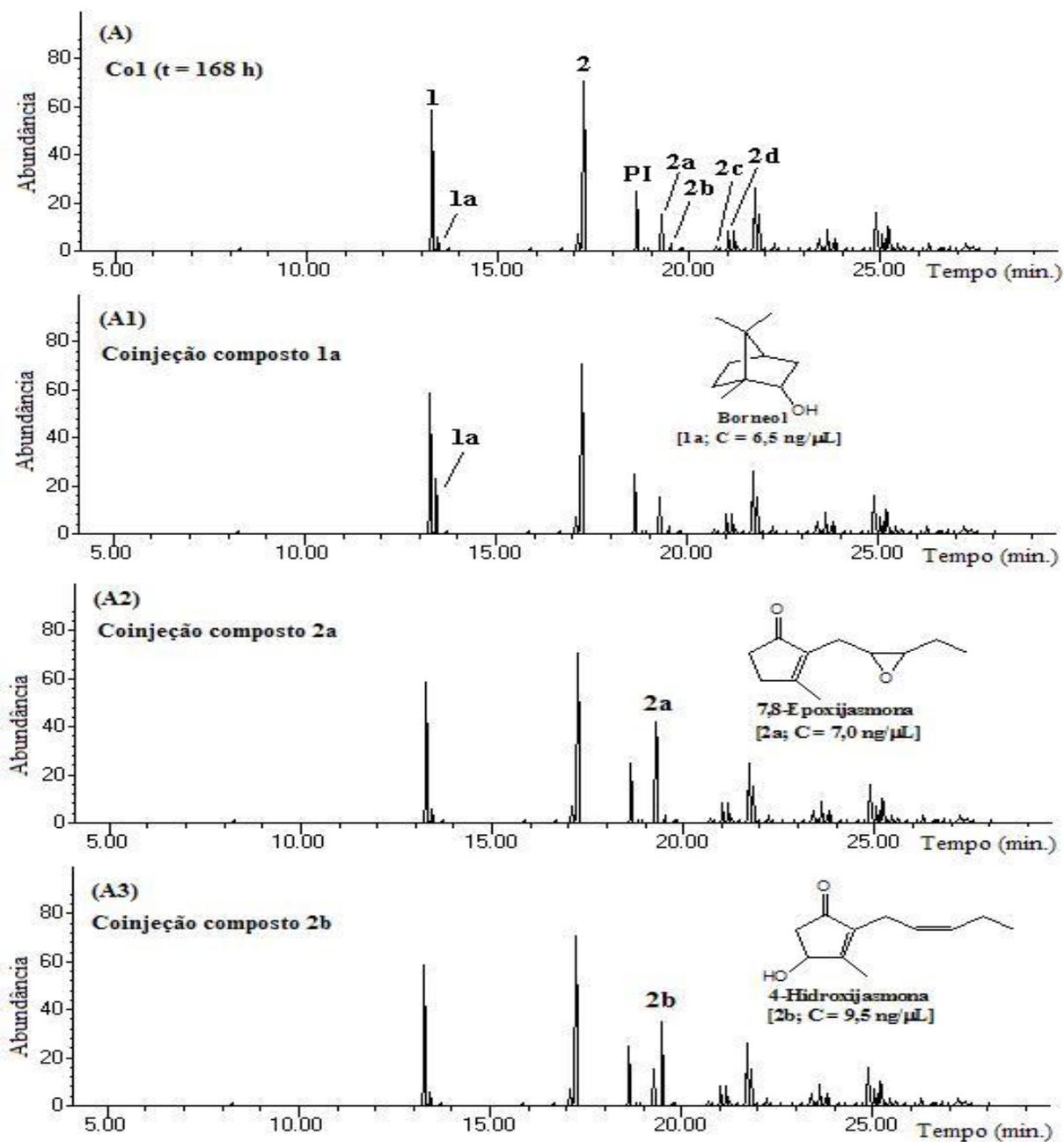


Figura 18. Confirmação da presença de Borneol, 7,8-Epoxijasmona e 4-Hidroxijasmona por coinjeção de padrões sintéticos por CG-EM. (A) Perfil cromatográfico da multibioreação com Col após 168 h e os substratos cânfora e *cis*-jasmona; (A1) Coinjeção do padrão sintético Borneol [1a]; (A2) Coinjeção do padrão sintético 7,8-Epoxijasmona (2a); (A3) Coinjeção do padrão sintético 4-Hidroxijasmona (2b).

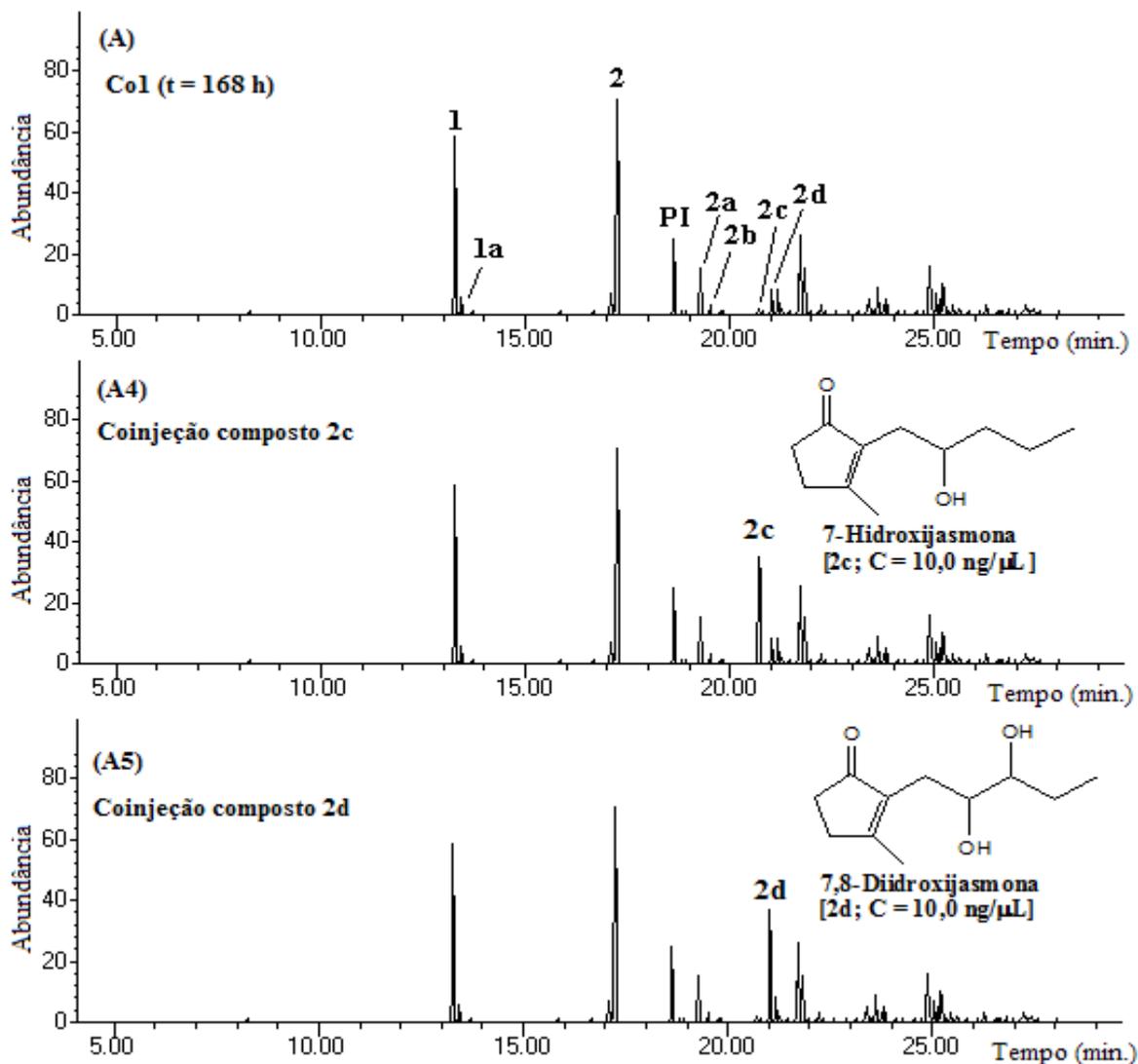
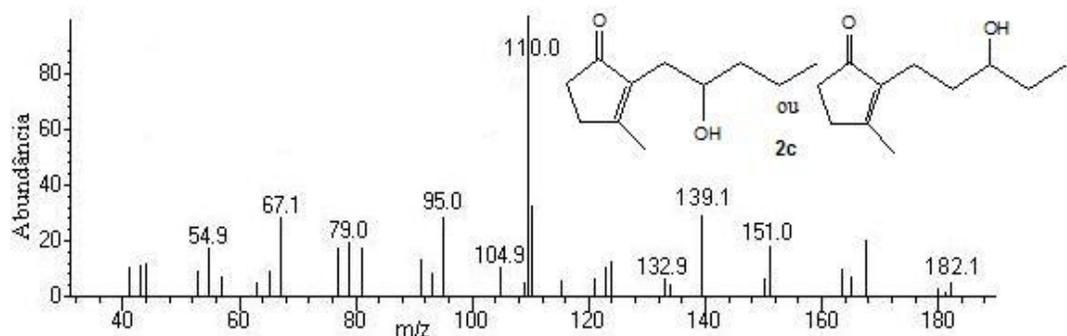
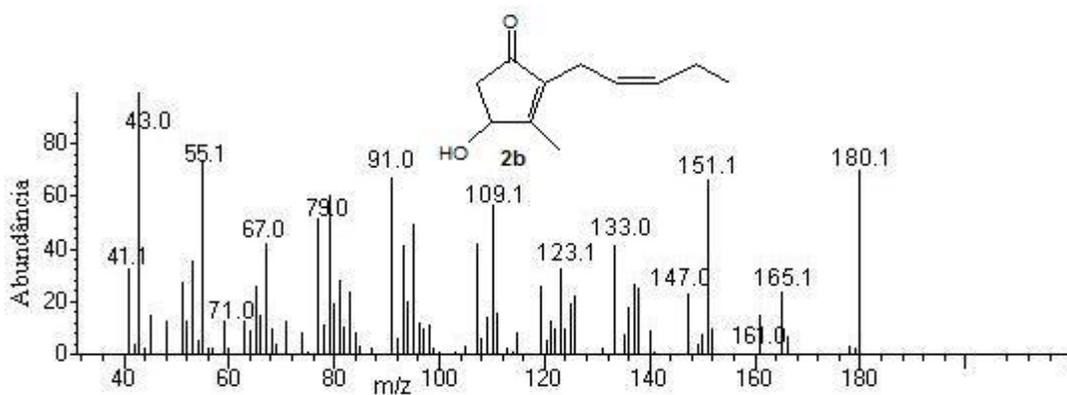
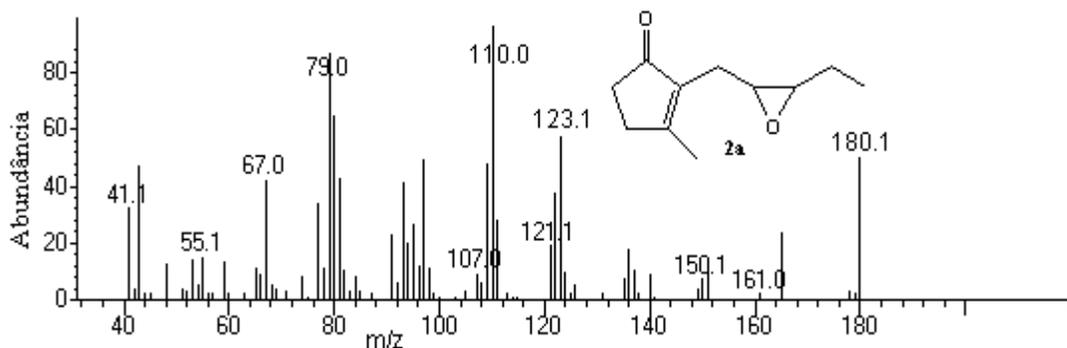
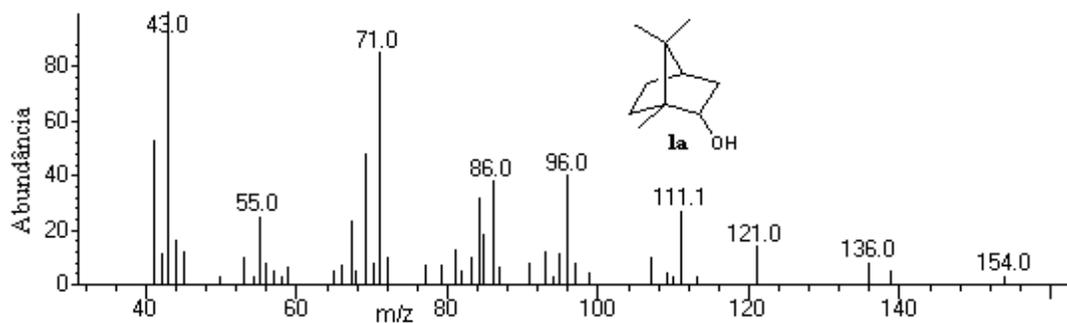


Figura 19. Confirmação da presença de 7-Hidroxijasmona e 7,8-Di-hidroxijasmona por coinjeção de padrões sintéticos por CG-EM. (A) Perfil cromatográfico da multibioreação com Co1 após 168 h e os substratos cânfora e *cis*-jasmona; (A4) Coinjeção do padrão sintético 7-Hidroxijasmona [2c]; (A5) Coinjeção do padrão sintético 7,8- Diidroxijasmona (2d).

Os espectros de massas para os produtos obtidos nesta primeira multibioreação estão representados na **Figura 20**.



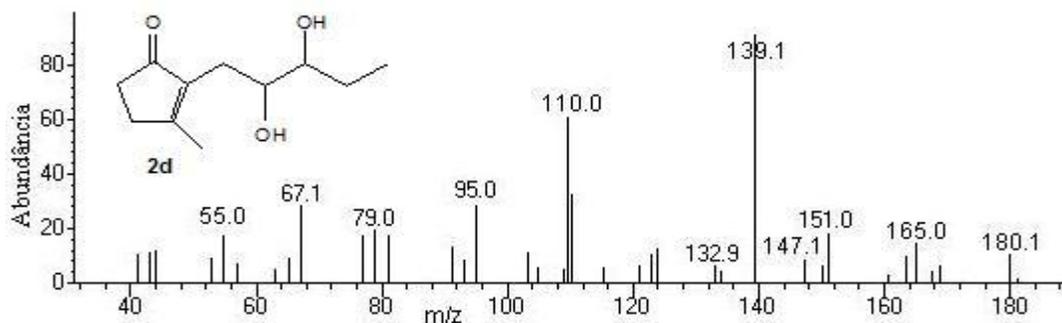


Figura 20. Espectros de massas representativos para os produtos **1a-2d** obtido na primeira multibioreação a partir de cânfora e *cis*-jasmona.

Uma segunda multibioreação foi realizada utilizando-se *cis*-jasmona (**2**), 2-metil-ciclohexanona (**3**), 1,2-epoxioctano (**4**), acetato (**5**), propionato (**6**) e octanoato (**7**) de feniletila [**Figura 13**], num mesmo pote reacional para monitorar simultaneamente monooxigenases e hidrolases. A **Figura 21** mostra o cromatograma de íons para estes substratos no tempo zero de reação.

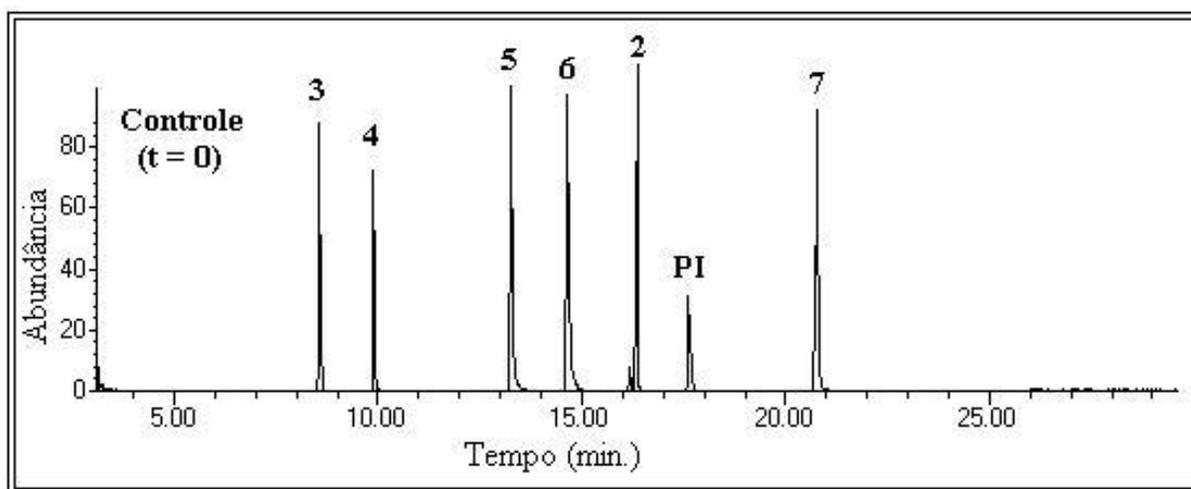
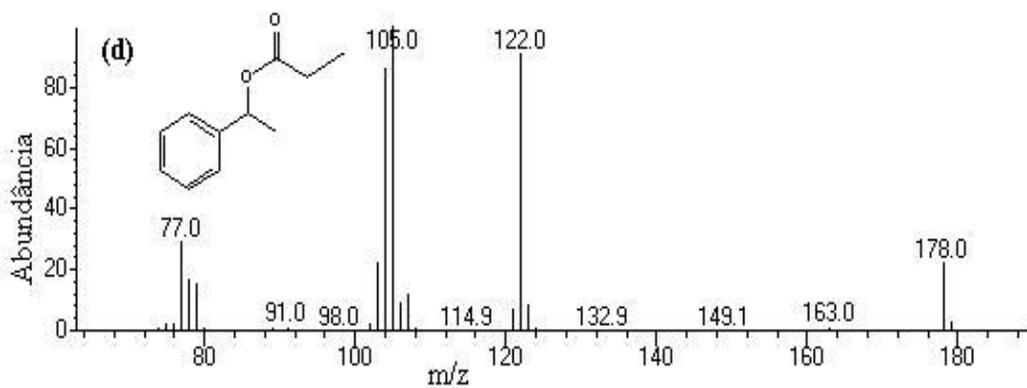
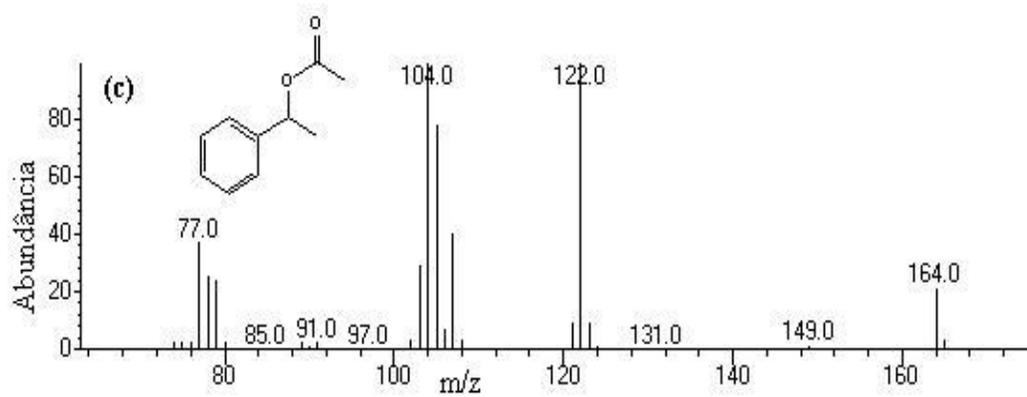
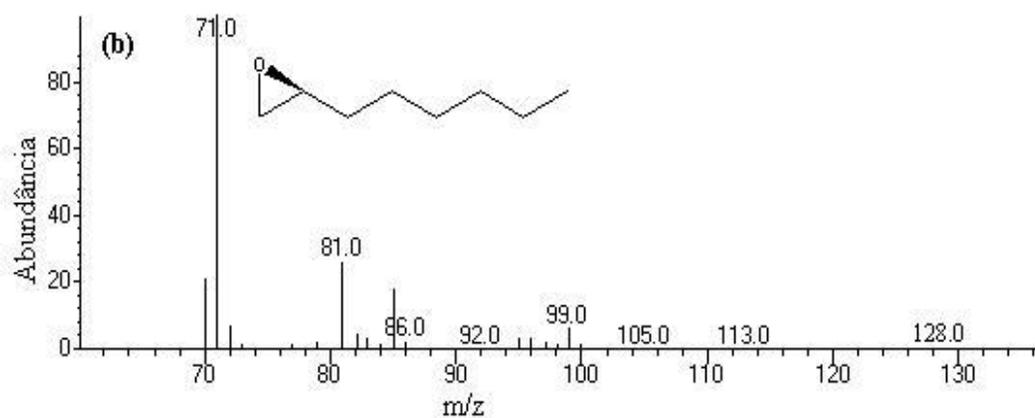
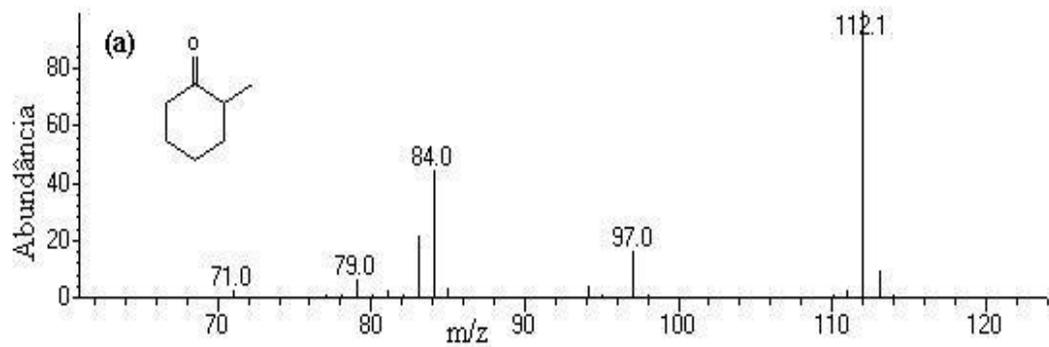


Figura 21. Cromatograma de íons (CG-EM) dos substratos utilizados na segunda multibioreação para monitorar monooxigenases e hidrolases simultaneamente.

Os espectros de massas para os substratos **3-7** estão representados na **Figura 22**.



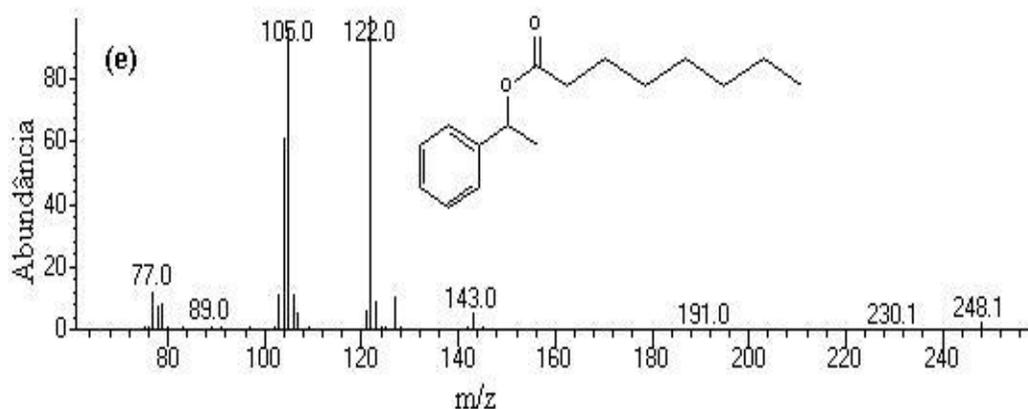


Figura 22. Espectros de massas dos substratos (a) 2-metil-cicloexanona; (b) 1,2-epoxioctano; (c) acetato de feniletila; (d) propionato de feniletila; (e) octanoato de feniletila.

As bioreações com *Bacillus pumilus* 6, *Brevibacillus* sp., *Dietzia* sp., *Methylobacterium* sp. e *Pseudomonas stutzeri* e as bactérias *Bacillus pumilus* SG 01, 04, 06, 12(1), 13, 49 e 54(2), bem como os consórcios Co1 e Co2 reduziram 2-metil-cicloexanona (**3**) em 2-metil-cicloexanol com 3, 8, 5, 9, 4, 10, 11, 3, 5, 2, 9, 17, 21 e 36 % de conversão, respectivamente. Os mesmos microrganismos hidrolisaram os ésteres **5**, **6** e **7** para feniletanol (**8**), confirmando a presença de lipases e esterases assim como nas triagens enzimáticas. A **Figura 23** mostra o cromatograma de íons totais para *Bacillus pumilus* SG04, representativo para as bactérias isoladas que apresentaram o mesmo resultado, enquanto a **Figura 24** mostra o cromatograma para o Co2, representativo de ambos os consórcios.

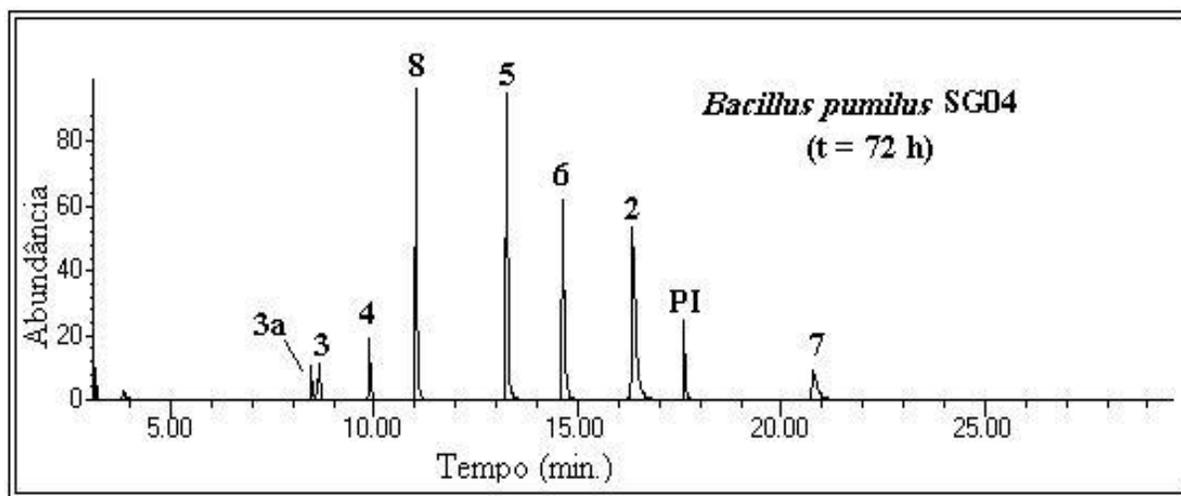


Figura 23. Cromatograma de íons (CG-EM) obtido após 72 horas de reação com *Bacillus pumilus* SG 04.

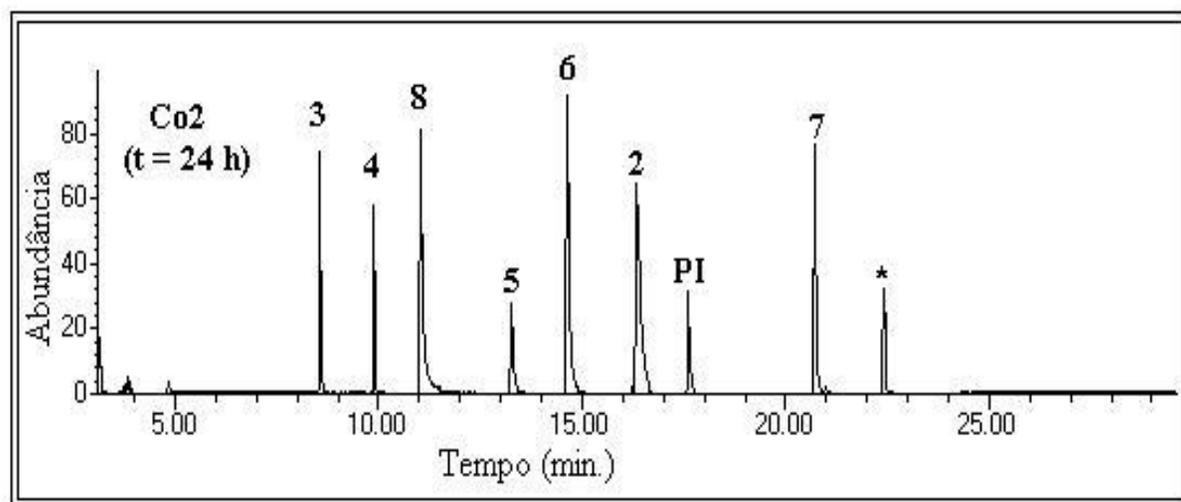
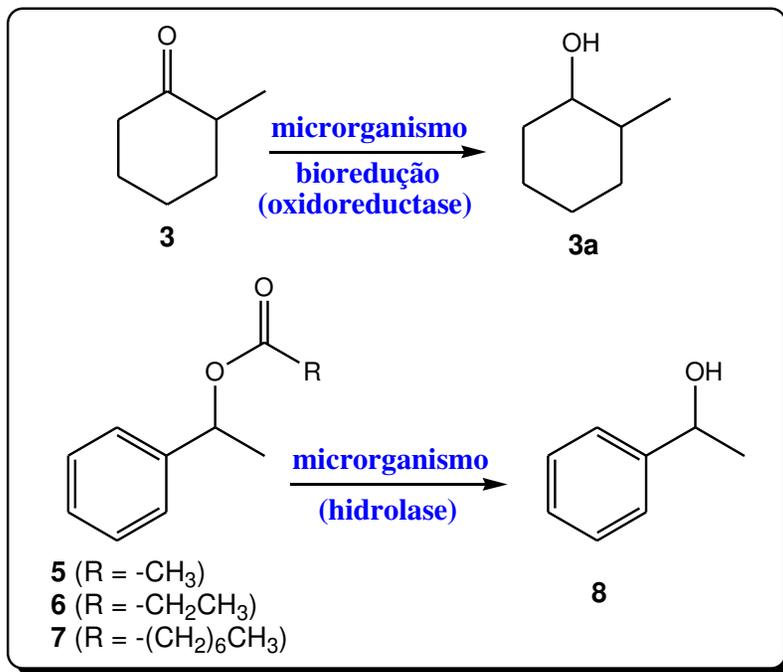


Figura 24. Cromatograma de íons (CG-EM) obtido após 24 horas de reação com Co₂.

O **Esquema 3** apresenta as biotransformações ocorridas e as enzimas envolvidas nesta segunda multibioreação utilizando os substratos de **3-7**.



Esquema 3. Produtos e enzimas detectados na segunda multibioreação com substratos **3** e **5-7**.

Os espectros de massas para os produtos, 2-metil-cicloexanol e feniletanol, detectados nesta segunda multibioreação, estão representados na **Figura 25**.

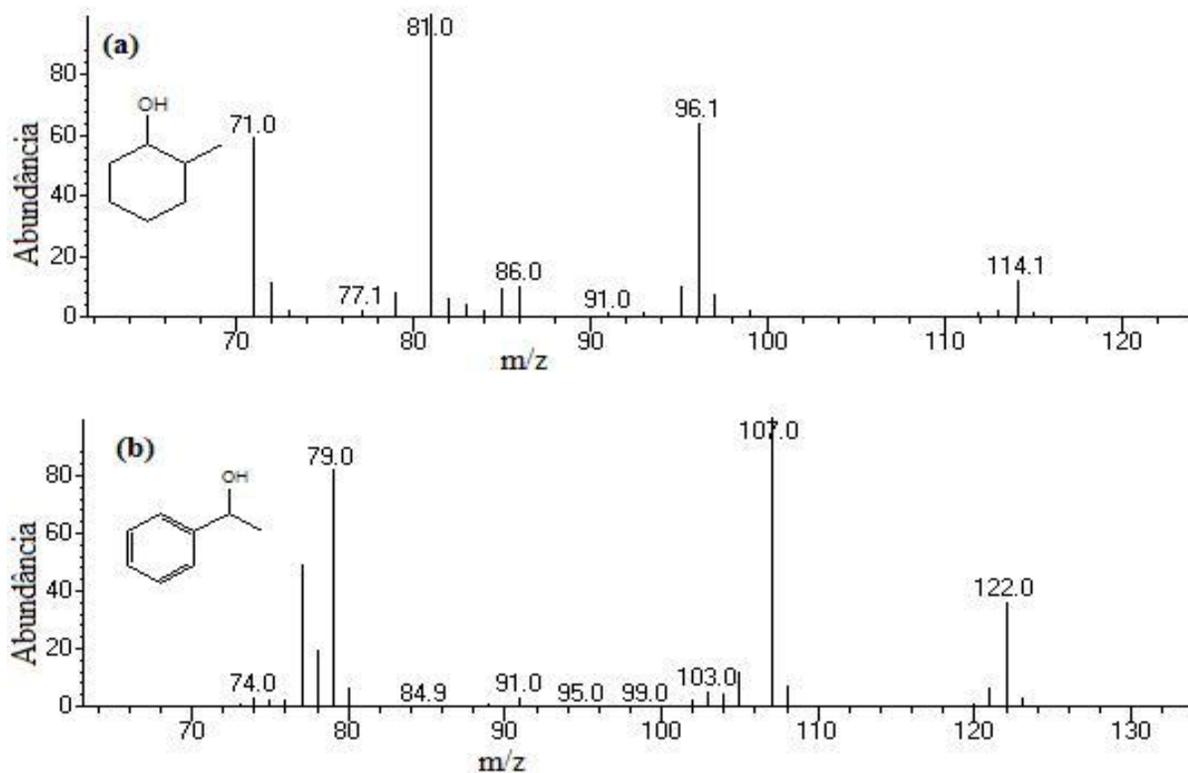


Figura 25. Espectros de massas dos substratos (a) 2-metil-cicloexanol; (b) feniletanol detectados na segunda multibioreação.

Neste segundo experimento, onde hidrolases e monooxigenases foram monitoradas simultaneamente, ao contrário do que ocorreu no primeiro ensaio, *cis*-jasmona permaneceu intacta, revelando nenhuma atividade de monooxigenase para os microrganismos. Este é um resultado inesperado e, provavelmente, ocorreu porque a presença dos ésteres no mesmo meio reacional pode ter inibido a atividade de monooxigenase que já havia sido observada através do primeiro experimento, onde apenas as cetonas estavam presentes.

Como ocorrido nos ensaios de HTS, nestas bioreações também foi possível observar que os consórcios hidrolisaram preferencialmente acetatos e as bactérias isoladas hidrolisaram os ésteres de cadeia mais longa (propionato e octanoato), assim: *Methylobacterium* sp. e *Pseudomonas stutzeri* foram seletivas para

propionatos (6), *Bacillus pumilus* SG 04, 06, 12(1) e 54(2) preferiram hidrolisar octanoatos (7), enquanto *Bacillus pumilus* 6, *Brevibacillus* sp., *Dietzia* sp. e *Bacillus pumilus* SG 01, 13 e 49 hidrolisaram todos os ésteres sem nenhuma quimiosseletividade. A **Tabela 10** mostra estes resultados de seletividade de ésteres após 50 % de conversão dos substratos.

Tabela 10. Seletividade para os ésteres acetato, propionato e octanoato de feniletila, após 50 % de conversão para o feniletanol

Microrganismos	Intensidade de Fluorescência (HTS)			$\Delta t_c > 50 \% (h)^a$		
	ES1	ES2	LIP1	5	6	7
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 1	< 1	561	< 1	24	> 4	24
<i>Bacillus pumilus</i> 6	188	970	1215	> 4	> 4	> 4
<i>Dietzia</i> sp. 1	135	1373	1133	24	24	24
Co1	148	92	101	24	> 48	48
<i>Bacillus pumilus</i> SG04	43	151	1641	72	72	48
<i>Bacillus pumilus</i> SG12	40	68	1016	48	48	24
Co2	126	98	82	4	48	> 48

A conversão de cânfora em borneol e de 2-metil-cicloexanona em 2-metil-cicloexanol caracteriza a presença de monooxigenases com capacidade de hidroxilar em 10 das 53 bactérias isoladas e também nos consórcios, entretanto a presença de uma possível BVMO não foi confirmada através das multibioreações.

Os microrganismos *Brevibacillus* sp., *Dietzia* sp., *Methylobacterium* sp. e *Bacillus pumilus* SG 01, 06, 49, 51 (1) foram os principais responsáveis pela epoxidação da dupla ligação da *cis*-jasmona indicando a presença de alceno monooxigenases (Gonçalves, 2004; Sicard, 2005).

Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que todos os microrganismos avaliados, tanto isoladamente quanto em consórcios, apresentaram propriedades enzimáticas interessantes de oxidorreduções (biorreduções e oxidações de cetonas), alceno monooxigenases (epoxidações de duplas ligações) e hidrolases (hidrólise de ésteres), que permitem afirmar que os mesmos participam dos processos de biodegradação do petróleo (Atlas, 1981; Ensign, 2001).

3.2 CAPÍTULO 2 – BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO

Este capítulo descreve os resultados obtidos nos ensaios de biodegradação *in vitro* com uma amostra de petróleo não biodegradada (**P1, Tabela 49, parte experimental, seção 4.2, pág.259**) utilizando os consórcios aeróbios (Co1 e Co2), anaeróbio (AN) e mistos (Co1AN e Co2AN). Os dados obtidos foram comparados com os de uma amostra de petróleo que sofreu biodegradação natural (*in vivo*) no reservatório (**P2, Tabela 49, parte experimental, seção 4.2, pág.259**).

Sabe-se que no processo de migração a composição do petróleo se altera devido ao contato com água e com rochas sedimentares. Baseado nisto, montamos experimentos com petróleo disperso no meio e adsorvido em algumas matrizes. Nos experimentos com matrizes, utilizou-se areia e folhelhos pré-tratados para simular condições presentes nas rochas reservatórios.

Através da análise por CG-EM das frações neutra (FN) e ácida (FAc), foi possível acompanhar o processo de biodegradação ocorrido nas classes de compostos abaixo relacionadas:

A) FRAÇÃO NEUTRA:

- ❖ *n*-Alcanos (parafinas normais) e isoprenóides (isoparafinas);
- ❖ Terpanos bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos (hopanos e norhopanos);
- ❖ Esteranos regulares;
- ❖ Alquilbenzenos, alquinaftalenos e alquilfenantrenos.

B) FRAÇÃO ÁCIDA

- ❖ Ésteres metílicos derivados de ácidos lineares;
- ❖ Ésteres metílicos derivados de ácidos bicíclicos e pentacíclicos.

Para avaliar o processo de biodegradação foi necessário realizar várias análises fazendo monitoramento de todos os íons (*Total Ion Chromatogram - TIC*)

e monitorando-se seletivamente alguns íons característicos das principais classes de biomarcadores (*Reconstructed Ion Chromatogram* - RIC e *Single Ion Monitoring* - SIM) [Tabela 11].

Tabela 11. Íons característicos das classes dos biomarcadores monitorados nos ensaios de biodegradação

Classes de Biomarcadores	Íons-fragmentos monitorados (<i>m/z</i>)
Alcanos lineares e isoprenóides	71, 183
Terpanos tricíclicos e tetracíclicos	123, 191
Terpanos pentacíclicos (hopanos)	191
Hopanos desmetilados (norhopanos)	177
Esteranos regulares	217
Alquibenzenos	92, 106, 120, 134
Alquinaftalenos	142, 156, 170, 184, 198
Alquifenantrenos	192, 206, 220
Ésteres metílicos derivados de ácidos lineares	74
Ésteres metílicos derivados de ácidos bicíclicos e tricíclicos	123, 191
Ésteres metílicos derivados de ácidos terpanóicos pentacíclicos	163, 177, 191, 207, 221, 235, 249, 263
Ésteres metílicos derivados de ácidos esteranóicos e alquil esteranóicos	217, 218, 231

O procedimento para obtenção das frações das amostras de petróleo avaliadas e as equações utilizadas para calcular os índices de retenção (IR), as taxas de biodegradação (TB) e o índice de preferência de carbono (IPC) para fração neutra estão descritos na parte experimental, *seções 4.5.3, pág.267 e 4.6, pág. 268*, respectivamente.

A análise da fração alifática da amostra P1, usada como fonte de carbono, revelou a distribuição de hidrocarbonetos saturados de nC_{13} a nC_{32} , indicando que esta amostra é apenas levemente biodegradada (nível 1), de acordo com a escala de Peters e Moldowan (1993) [Figura 26].

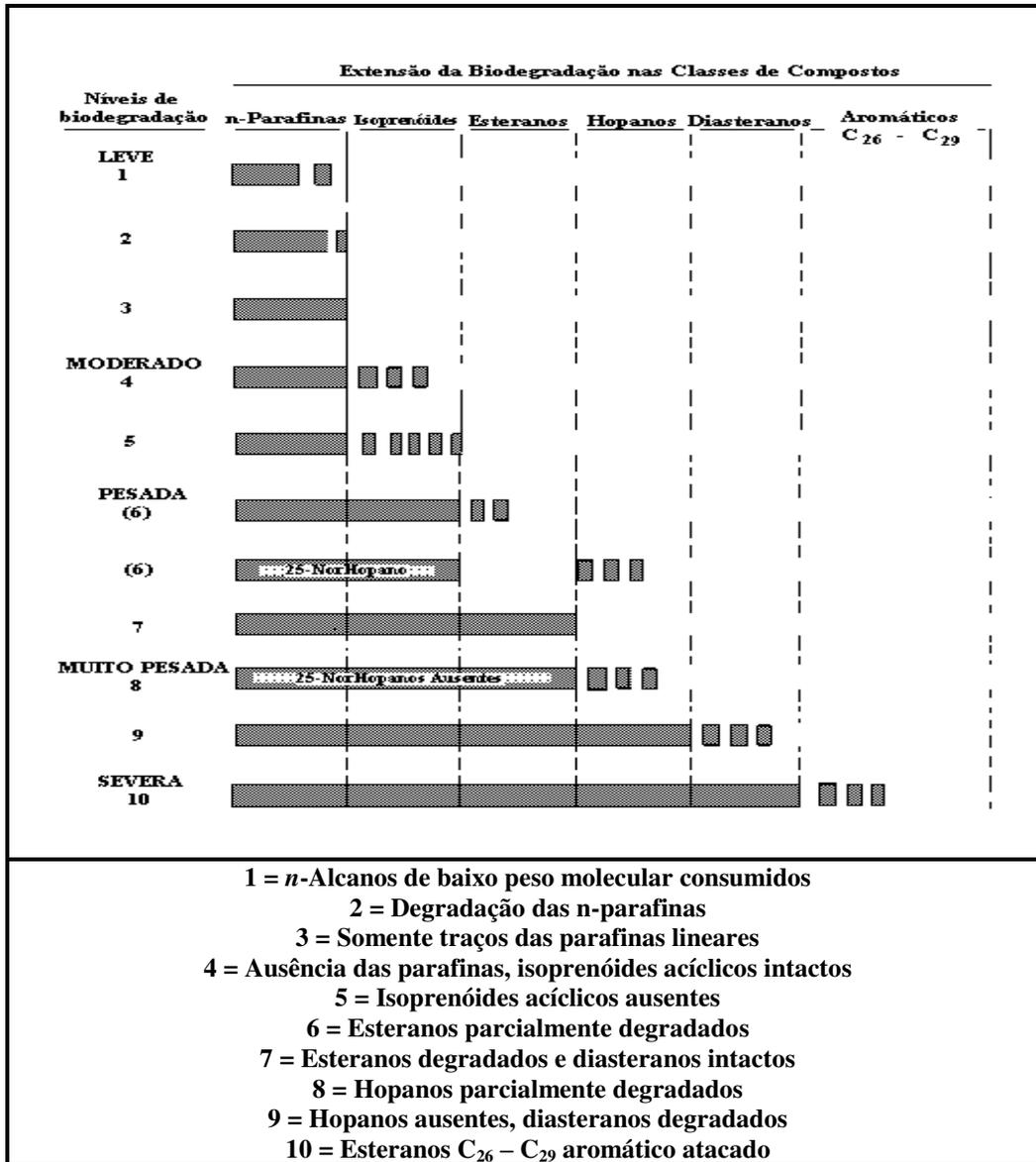


Figura 26. Classificação do grau ou nível de biodegradação em amostras de óleos, de acordo com a extensão da biodegradação dos biomarcadores (Adaptado de Peters e Moldowan, 1993).

A análise do IPC mostrou que esta amostra tem uma predominância de compostos com número ímpar de carbono sobre os compostos com número par de carbonos ($IPC > 1,00$).

A amostra P2, utilizada como parâmetro de comparação, é uma amostra com nível de biodegradação de 5-6 correspondente ao da escala de Peters e Moldowan (1993) [Figura 27], visto que a série homóloga de *n*-alcanos entre nC_{13} a nC_{32} está ausente quando comparado ao perfil da amostra P1. Observa-se também que os isoprenóides, Pristano (C_{19} , P) e Fitano (C_{20} , F), foram completamente biodegradados com concomitante aumento da concentração dos terpanos e esteranos que eluem entre 35 e 60 minutos como indicado na Figura 27 para as amostras P1 e P2.

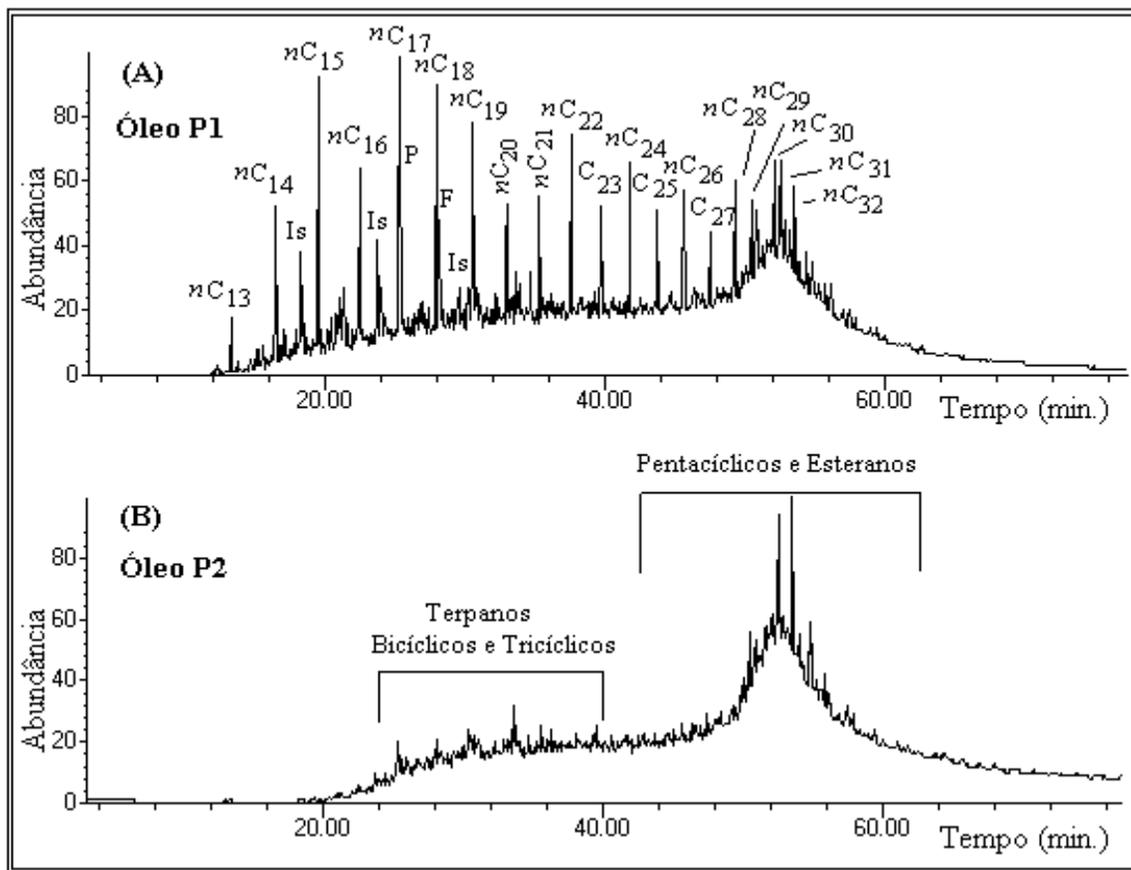


Figura 27. TIC das amostras (A) P1, utilizada nos ensaios e (B) P2, utilizada como parâmetro de comparação. nC_{13} - nC_{32} = *n*-alcanos; Is = Isoprenóides acíclicos; P = Pristano; F = Fitano.

Pristano e Fitano são os isoprenóides mais abundantes em óleos e a razão entre eles (P/F) é um parâmetro geoquímico estabelecido para caracterizar ambientes deposicionais (origem) e maturação de óleos e sedimentos. Esta razão quando não está afetada pelo processo de biodegradação sendo maior que um ($P/F > 1$) o ambiente deposicional da geradora correspondente é dito oxidante e menor que um ($P/F < 1$) o ambiente deposicional é redutor (Didyk *et al.*, 1978). As razões P/n-C₁₇ e F/n-C₁₈, utilizadas como parâmetros de maturação dos óleos, também são afetadas pela biodegradação pois os *n*-alcanos são degradados preferencialmente pela ação de microrganismos. Neste estudo, a amostra P1 apresenta razão P/F igual a 2,30 e as razões P/n-C₁₇ e F/n-C₁₈ iguais a 0,86 e 0,94, respectivamente [Tabela 43, pág. 213].

3.2.1 BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA (Co1 e Co2)

3.2.1.1 Análise da fração neutra saturada com petróleo disperso no meio

3.2.1.1.1 *n*-alcanos e isoprenóides

O perfil cromatográfico de uma amostra de petróleo constitui sua impressão digital e é uma das primeiras indicações da ocorrência de biodegradação, visto que, os compostos lineares são os mais abundantes em óleos não biodegradados e, por isso, os primeiros a serem consumidos pelos microrganismos. Desta forma, quando o perfil da amostra revela diminuição da concentração destes compostos, diz-se que o petróleo sofreu biodegradação tornando-se gradativamente mais pesado e mais ácido (van Hamme *et al.*, 2003).

Neste trabalho avaliou-se a biodegradação através da análise dos cromatogramas obtidos para cada classe de biomarcadores de acordo com os íons-fragmentos listados na **Tabela 11**, *pág. 70*.

A microbiota responsável pelo processo de biodegradação nas condições aeróbias com P1 disperso no meio foram identificadas como sendo pertencentes aos gêneros *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Mezorhizobium* e *Bordetella*, todos descritos na literatura como degradadores de hidrocarbonetos e/ou associadas a ambientes contaminados com óleo [**Figura 11**, *capítulo 1, seção 3.1.1, pág. 42*] (Bieszkiewicz *et al.*, 1998; Orphan *et al.*, 2000; Chaillan *et al.*, 2004; Pineda-Flores *et al.*, 2004).

As **Figuras 28** e **29** apresentam os RICs de m/z 71 utilizando P1 disperso no meio mostrando o incremento da biodegradação pelos consórcios Co1 e Co2, respectivamente.

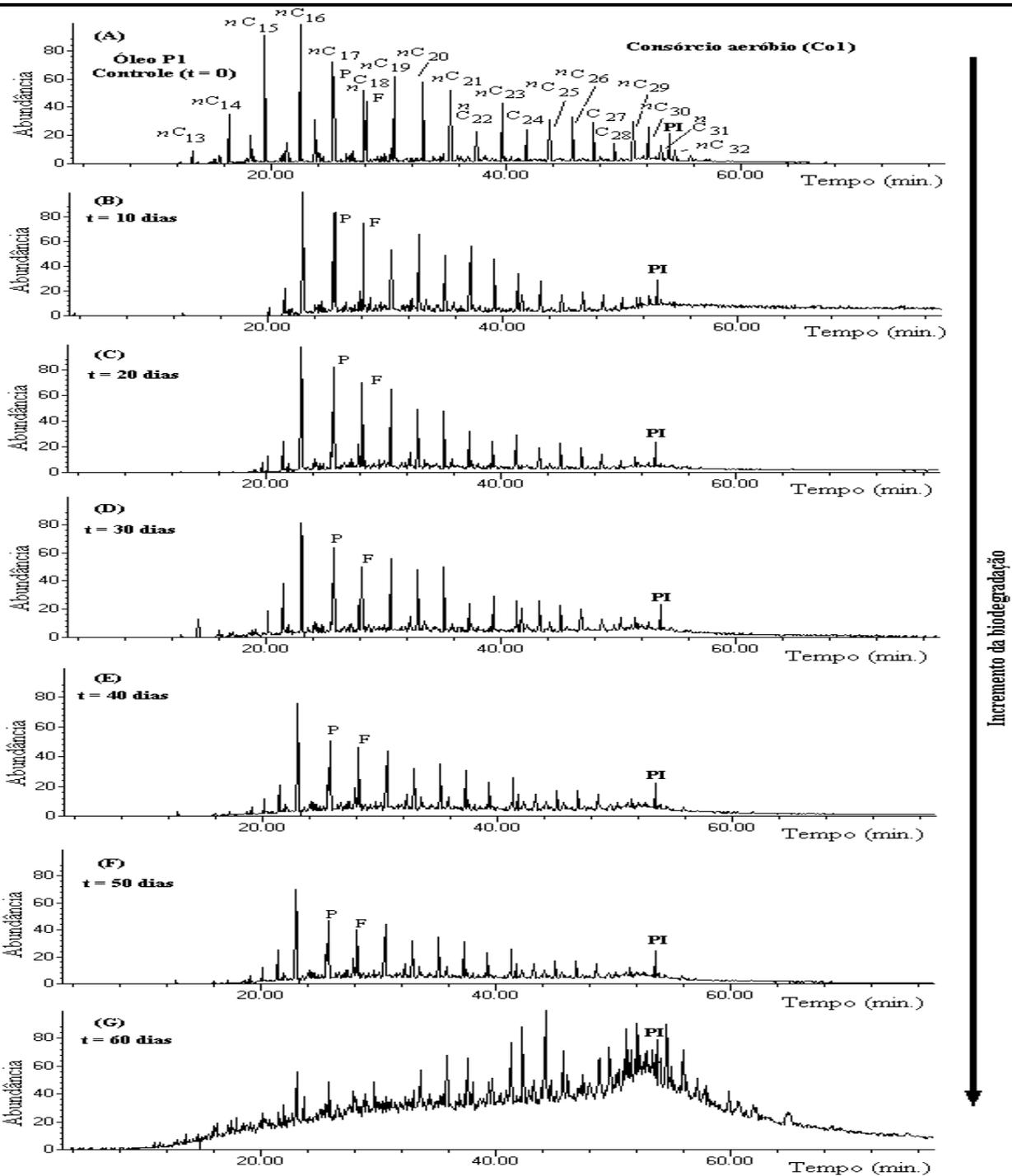


Figura 28. RIC m/z 71 mostrando o aumento da biodegradação de PI disperso no meio pelo Co1. n -C₁₃-nC₃₂ = n -alcanos; P = Pristano; F = Fitano e PI = Padrão Interno (5 α -colestano-3-ona).

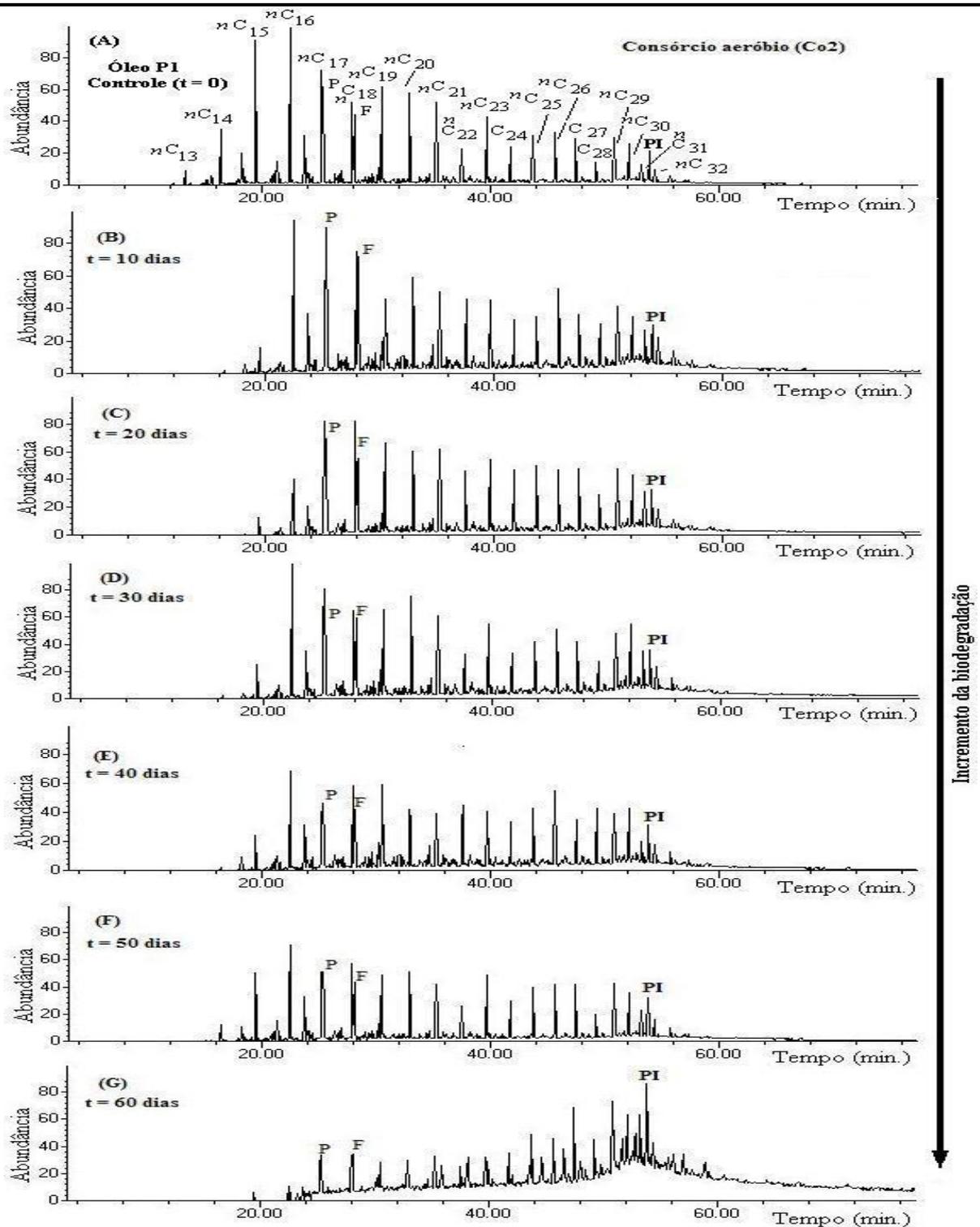


Figura 29. RIC m/z 71 mostrando o aumento da biodegradação de PI disperso no meio pelo Co2. $n-C_{13}-nC_{32} = n$ -alcanos; P = Pristano; F = Fitano e PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

Observa-se o incremento do processo de biodegradação ao longo do período de monitoramento para ambos os consórcios. Em 60 dias de ensaio observou-se que a série homóloga de *n*-alcanos e os isoprenóides P e F foram mais biodegradados quando utilizou-se Co1 em comparação ao Co2. Neste mesmo período, observa-se a formação de uma mistura complexa não resolvida e o aumento da concentração de terpanos e esteranos na região de 35 a 60 minutos mais pronunciada com o Co1, semelhantes à amostra biodegradada naturalmente no reservatório, petróleo P2, [Figura 27, pág. 72].

As Tabelas 12 e 13 apresentam as taxas de biodegradação (TB %) para os *n*-alcanos de C₁₃-C₃₂ e isoprenóides P e F de 10 a 60 dias de monitoramento com os consórcios Co1 e Co2, respectivamente.

Tabela 12. Taxas de biodegradação (%) para *n*-alcanos e isoprenóides com consórcio aeróbio Co1

Pico	Composto	Fórmula	MM ^a	Taxas de biodegradação (%) ^b /Tempo (dias)					
				10	20	30	40	50	60
<i>n</i> C ₁₃	<i>n</i> -Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	184	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₄	<i>n</i> -Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀	198	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₅	<i>n</i> -Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	212	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₆	<i>n</i> -Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	226	15 ± 1,8	17 ± 6,1	20 ± 2,2	22 ± 4,3	45 ± 5,0	94 ± 2,1
<i>n</i> C ₁₇	<i>n</i> -Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	240	5 ± 2,0	49 ± 1,4	97 ± 1,8	98 ± 2,3	> 99 ± 3,2	> 99 ± 2,4
P	Pristano	C ₁₉ H ₄₀	268	10 ± 3,1	49 ± 1,5	58 ± 4,1	64 ± 2,1	80 ± 2,4	> 99 ± 1,1
<i>n</i> C ₁₈	<i>n</i> -Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	254	7 ± 1,6	37 ± 0,1	46 ± 0,9	59 ± 2,2	68 ± 1,1	99 ± 3,1
F	Fitano	C ₂₀ H ₄₂	282	6 ± 0,9	13 ± 1,6	45 ± 2,4	56 ± 3,4	59 ± 0,5	> 99 ± 1,2
<i>n</i> C ₁₉	<i>n</i> -Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	268	31 ± 0,2	41 ± 1,5	45 ± 2,0	64 ± 3,2	74 ± 2,3	99 ± 0,6
<i>n</i> C ₂₀	<i>n</i> -Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	282	21 ± 2,0	27 ± 2,6	53 ± 1,4	59 ± 1,2	72 ± 1,0	> 99 ± 4,2
<i>n</i> C ₂₁	<i>n</i> -Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	296	31 ± 0,9	37 ± 2,5	39 ± 3,1	41 ± 0,9	86 ± 1,5	> 99 ± 3,7
<i>n</i> C ₂₂	<i>n</i> -Docosano	C ₂₂ H ₄₆	310	31 ± 3,0	38 ± 3,6	58 ± 2,2	71 ± 1,1	76 ± 1,9	> 99 ± 5,1
<i>n</i> C ₂₃	<i>n</i> -Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	324	28 ± 3,7	38 ± 2,8	53 ± 1,3	54 ± 2,0	68 ± 1,7	99 ± 4,2
<i>n</i> C ₂₄	<i>n</i> -Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	338	20 ± 2,9	20 ± 1,2	51 ± 2,4	50 ± 1,2	64 ± 1,5	> 99 ± 3,3
<i>n</i> C ₂₅	<i>n</i> -Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	352	31 ± 1,1	41 ± 1,1	44 ± 3,5	57 ± 2,2	70 ± 1,3	> 99 ± 1,7
<i>n</i> C ₂₆	<i>n</i> -Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	366	16 ± 0,6	28 ± 0,9	37 ± 1,6	50 ± 1,4	61 ± 1,1	99 ± 3,8
<i>n</i> C ₂₇	<i>n</i> -Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	380	14 ± 1,0	18 ± 0,7	36 ± 0,7	44 ± 0,8	55 ± 1,2	98 ± 2,6
<i>n</i> C ₂₈	<i>n</i> -Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	394	24 ± 2,0	28 ± 1,9	33 ± 2,8	58 ± 1,6	59 ± 1,0	> 99 ± 2,5
<i>n</i> C ₂₉	<i>n</i> -Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	408	3 ± 1,8	4 ± 1,6	25 ± 1,9	49 ± 1,8	55 ± 1,9	99 ± 3,0
<i>n</i> C ₃₀	<i>n</i> -Triacontano	C ₃₀ H ₆₂	422	16 ± 0,8	34 ± 2,1	51 ± 1,0	52 ± 1,2	51 ± 2,1	> 99 ± 4,1
<i>n</i> C ₃₁	<i>n</i> -Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	436	14 ± 2,6	45 ± 2,5	47 ± 1,1	79 ± 0,6	99 ± 3,0	98 ± 1,9
<i>n</i> C ₃₂	<i>n</i> -Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆	450	24 ± 3,6	36 ± 2,3	40 ± 2,0	47 ± 2,2	60 ± 3,5	> 99 ± 2,3

^aMM = Massa Molecular; ^bMédia de duplicata, desvio padrão (n=2).

Tabela 13. Taxas de biodegradação (%) para *n*-alcanos e isoprenóides com consórcio aeróbio Co2

Pico	Composto	Fórmula	MM ^a	Taxas de biodegradação (%) ^b /Tempo (dias)					
				10	20	30	40	50	60
<i>n</i> C ₁₃	<i>n</i> -Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	184	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₄	<i>n</i> -Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀	198	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₅	<i>n</i> -Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	212	98 ± 0,4	99 ± 0,2	98 ± 1,0	98 ± 1,1	99 ± 0,9	ausente
<i>n</i> C ₁₆	<i>n</i> -Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	226	36 ± 2,0	79 ± 3,1	86 ± 1,4	85 ± 4,1	94 ± 2,1	> 99 ± 2,4
<i>n</i> C ₁₇	<i>n</i> -Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	240	75 ± 1,8	97 ± 2,2	98 ± 1,5	99 ± 3,2	> 99 ± 2,3	> 99 ± 2,4
P	Pristano	C ₁₉ H ₄₀	268	14 ± 6,1	38 ± 1,8	46 ± 4,3	50 ± 5,0	90 ± 2,1	91 ± 1,0
<i>n</i> C ₁₈	<i>n</i> -Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	254	3 ± 0,1	55 ± 1,6	55 ± 1,1	98 ± 3,1	99 ± 0,9	> 99 ± 2,2
F	Fitano	C ₂₀ H ₄₂	282	4 ± 2,5	14 ± 0,9	28 ± 3,2	49 ± 2,0	78 ± 0,8	85 ± 1,2
<i>n</i> C ₁₉	<i>n</i> -Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	268	4 ± 2,6	17 ± 2,0	36 ± 3,4	42 ± 2,4	51 ± 1,3	75 ± 0
<i>n</i> C ₂₀	<i>n</i> -Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	282	6 ± 1,5	23 ± 0,2	30 ± 0,9	33 ± 3,1	34 ± 2,0	94 ± 4,0
<i>n</i> C ₂₁	<i>n</i> -Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	296	7 ± 1,6	15 ± 0,9	21 ± 1,2	23 ± 1,4	30 ± 1,8	92 ± 1,7
<i>n</i> C ₂₂	<i>n</i> -Docosano	C ₂₂ H ₄₆	310	5 ± 1,4	21 ± 2,4	27 ± 2,3	32 ± 1,7	35 ± 1,0	92 ± 1,2
<i>n</i> C ₂₃	<i>n</i> -Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	324	10 ± 1,7	12 ± 2,2	15 ± 1,4	27 ± 2,6	35 ± 2,0	92 ± 2,4
<i>n</i> C ₂₄	<i>n</i> -Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	338	1 ± 1,9	27 ± 1,5	29 ± 1,4	34 ± 1,5	92 ± 1,6	95 ± 3,1
<i>n</i> C ₂₅	<i>n</i> -Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	352	3 ± 2,1	17 ± 1,9	19 ± 2,5	28 ± 1,2	30 ± 2,3	86 ± 1,9
<i>n</i> C ₂₆	<i>n</i> -Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	366	1 ± 2,6	9 ± 0,0	18 ± 1,7	22 ± 2,4	28 ± 3,1	86 ± 1,8
<i>n</i> C ₂₇	<i>n</i> -Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	380	2 ± 3,0	3 ± 0,8	7 ± 2,7	10 ± 3,8	28 ± 3,2	83 ± 2,0
<i>n</i> C ₂₈	<i>n</i> -Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	394	11 ± 1,0	11 ± 2,9	13 ± 1,8	17 ± 2,6	18 ± 2,0	77 ± 1,5
<i>n</i> C ₂₉	<i>n</i> -Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	408	18 ± 3,8	25 ± 3,6	68 ± 1,9	76 ± 1,9	81 ± 2,9	81 ± 1,0
<i>n</i> C ₃₀	<i>n</i> -Triacontano	C ₃₀ H ₆₂	422	7 ± 1,8	38 ± 1,1	62 ± 2,0	78 ± 1,4	80 ± 1,1	94 ± 1,4
<i>n</i> C ₃₁	<i>n</i> -Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	436	2 ± 2,7	3 ± 2,4	7 ± 3,4	8 ± 2,6	40 ± 3,2	53 ± 1,8
<i>n</i> C ₃₂	<i>n</i> -Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆	450	13 ± 2,5	22 ± 1,5	26 ± 2,7	29 ± 1,2	41 ± 2,5	44 ± 3,2

^aMM = Massa Molecular; ^bMédia de duplicata, desvio padrão (n=2).

Durante o processo de biodegradação com Co1 e Co2, utilizando P1 disperso no meio, nota-se pelas **Tabelas 12 e 13** que os *n*-alcanos de menor peso molecular (C₁₃-C₁₇) foram mais suscetíveis ao processo de biodegradação com Co2 (variando de 36 a 99 %) na fase inicial (10 a 20 dias). Enquanto que, no decorrer do processo, os *n*-alcanos mais pesados (> C₁₈) foram mais biodegradados pelo Co1 (variando de 7 a > 99 %).

A degradação de *n*-alcanos antes dos isoprenóides, para ambos os consórcios, resultou nas altas razões P/nC₁₇ e F/nC₁₈. Porém, enquanto estas razões aumentam com a biodegradação, ocorre um decréscimo na razão P/F sugerindo que pristano é degradado mais rapidamente que fitano [**Tabela 43**, *pág. 213*]. Alexander *et al.* (1981), sugere o uso da razão $(P + nC_{17})/(F + nC_{18})$ por que é menos afetada por variações da maturidade térmica que as razões P/nC₁₇ e F/nC₁₈.

A análise dos resultados obtidos através das taxas de biodegradação e do IPC [**Tabela 43**, *pág. 213*] revelou que os **consórcios aeróbios degradam preferencialmente *n*-alcanos com número par de carbonos em comparação com os *n*-alcanos com número ímpar de carbono**. Isto é uma evidência de que a biodegradação influencia também o parâmetro IPC e por isso, ele deve ser utilizado com cautela para avaliar geoquimicamente os óleos.

3.2.1.1.2 Sesquiterpanos Bicíclicos

Os sesquiterpanos bicíclicos não são rotineiramente analisados em amostras de óleos pois podem ser originados durante a degradação microbiana (Weston *et al.*, 1989) e/ou resultar da degradação térmica de terpanos tricíclicos, tetracíclicos e/ou pentacíclicos (Trendel *et al.*, 1982; Sonibare & Ekweozor, 2004).

Os bicíclicos de C₁₄-C₁₆ são menos suscetíveis a biodegradação que os isoprenóides mas são completamente removidos antes dos hopanos e esteranos (Alexander *et al.*, 1983b; Peters *et al.*, 2005).

Quando P1 foi incubado com Co1 num ensaio de 60 dias, observou-se através da análise do RIC *m/z* 123 o enriquecimento dos bicíclicos 9, 10, 11, 13 e 14, que pode ser resultante da biodegradação de terpanos tricíclicos, tetracíclicos e/ou pentacíclicos. Ao contrário dos compostos citados acima, o bicíclico 12 sofreu biodegradação após este período [**Figuras 30 e 32**]. O Co2 degradou todos os bicíclicos presentes na amostra controle [**Figuras 31e 32**].

Como não realizou-se SIM para a classe de bicíclicos, não foi possível quantificar o enriquecimento destes compostos pelo Co1 e tampouco medir a extensão da biodegradação que eles sofreram pelo Co2.

As **Figuras 30 e 31** mostram os RICs *m/z* 123 no tempo zero e após 60 dias de incubação com Co1 e Co2, respectivamente. E as estruturas para os sesquiterpanos bicíclicos detectados neste estudo estão representadas na **Figura 32**.

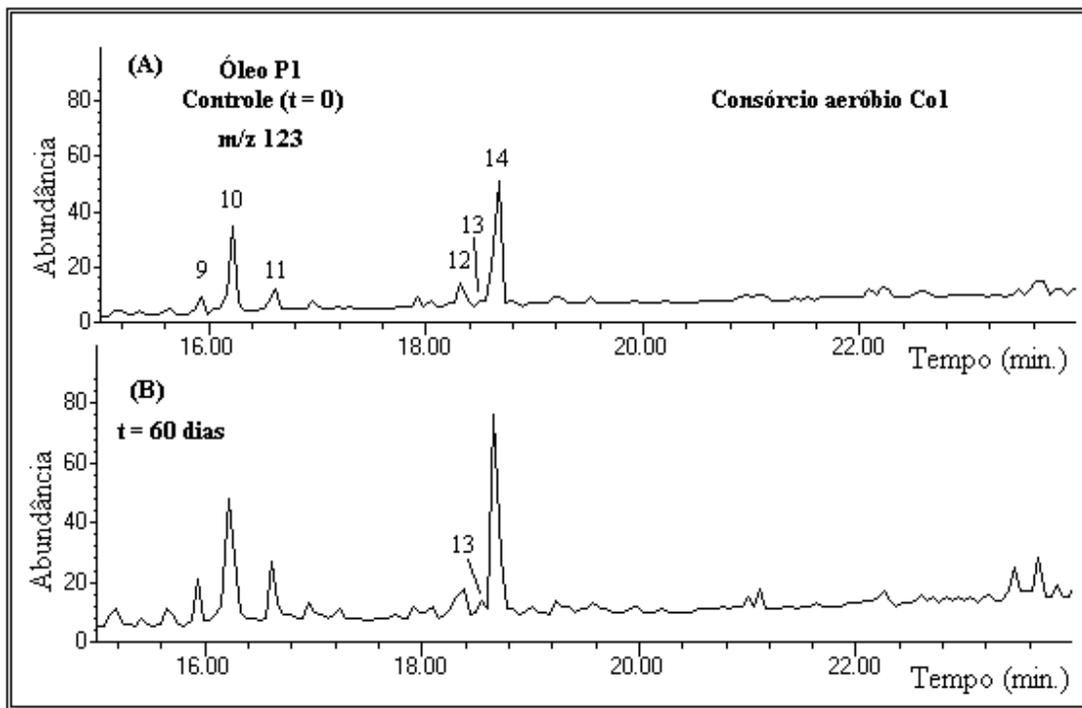


Figura 30. RIC m/z 123 dos sesquiterpanos bicíclicos detectados (A) na amostra controle ($t = 0$) e (B) após 60 dias de incubação com Co1.

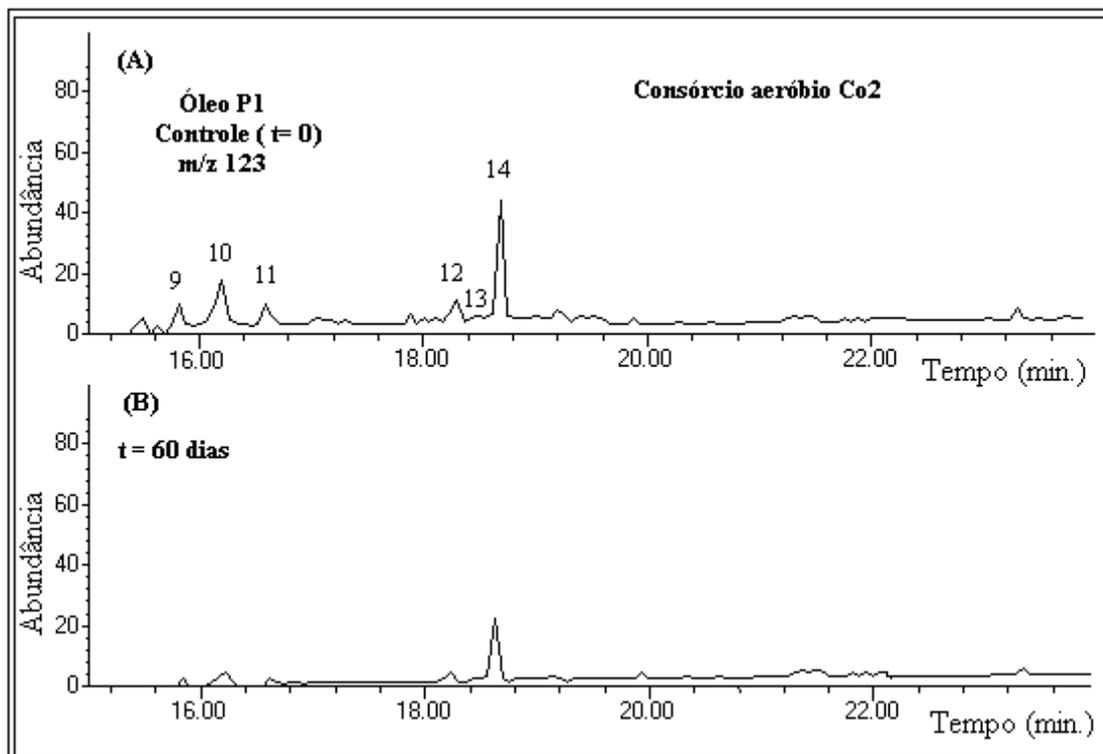


Figura 31. RIC m/z 123 dos sesquiterpanos bicíclicos detectados (A) na amostra controle ($t = 0$) e (B) após 60 dias de incubação com Co2.

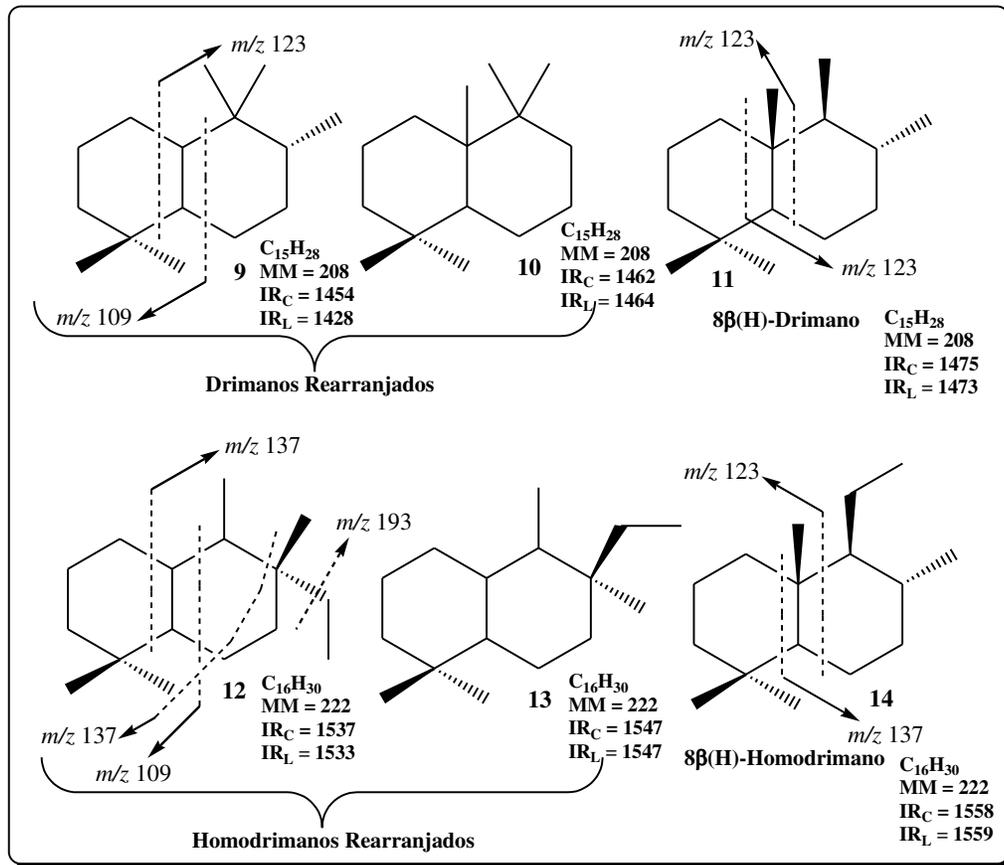


Figura 32. Estruturas propostas com base nos espectros de massa e IR da literatura para os sesquiterpanos bicíclicos detectados nos ensaios de biodegradação incubados com Co1 e Co2. IR_C = Índice de retenção calculado; IR_L = Índice de retenção da literatura (Lima, 2005).

Os espectros de massas representativos para os sesquiterpanos bicíclicos, picos 10 e 14, estão representados na **Figura 33**.

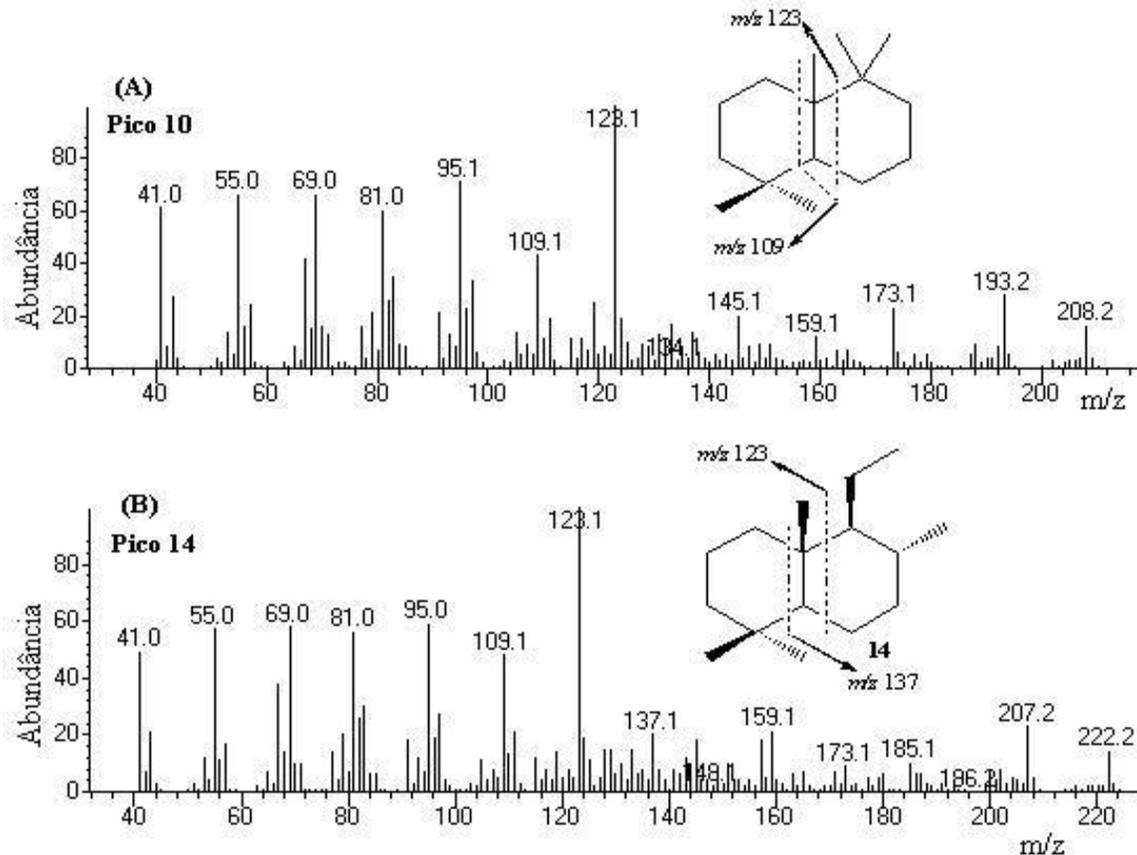


Figura 33. Espectros de massas representativos para os sesquiterpenos bicíclicos, (A) pico 10 e (B) pico 14.

Não existem relatos sobre enriquecimento de bicíclicos em simulações de biodegradação como encontrado neste estudo com o Co1. Existem trabalhos na literatura que mostram a remoção seletiva de 8β (H)-homodrimano (**pico 14**) em óleos biodegradados no reservatório onde não houve degradação de hopanos e esteranos (Williams *et al.*, 1986). E também que em óleos onde hopanos e esteranos são parcialmente biodegradados observa-se a ausência de terpanos bicíclicos (Hoffmann & Strausz, 1986). Baseado nisto, sugere-se que enriquecimento dos bicíclicos pelo Co1 possam ser originados a partir da degradação microbiana de terpanos tricíclicos, tetracíclicos e/ou pentacíclicos (Weston *et al.*, 1989).

Em estudos de simulações de laboratório, Kuo (1994) observou que os sesquiterpanos bicíclicos também podem sofrer processos de alteração por *water washing* (“lixiviação”), contrário ao que se observa para terpanos tricíclicos e diterpanos que exibem baixa ou nenhuma alteração por “lixiviação”. Devido a isso, deve-se ter cautela ao utilizar a ausência de terpanos bicíclicos como indicador do nível de biodegradação em óleos por que eles podem ser removidos tanto por *water washing* como por biodegradação microbiana.

3.2.1.1.3 Terpanos Tricíclicos, Tetracíclicos e Pentacíclicos

Os terpanos tricíclicos [Figura 34] são usados em geoquímica como biomarcadores de correlação óleo-óleo, óleo-rocha geradora e ainda para indicar o nível de maturação e biodegradação de óleos (Seifert & Moldowan, 1981; Peters & Moldowan, 1993).

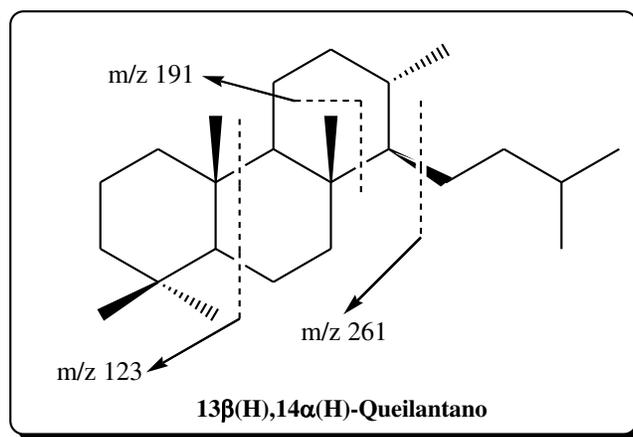


Figura 34. Terpano tricíclico e seus principais fragmentos de massas.

Alguns autores sugerem que os tricíclicos são originados a partir da ciclização anaeróbia de hexaprenol, que gera triciclohexaprenol como precursor direto (Aquino Neto *et al.*, 1981; Ourisson *et al.*, 1984; Peters & Moldowan, 1993) [Figura 35].

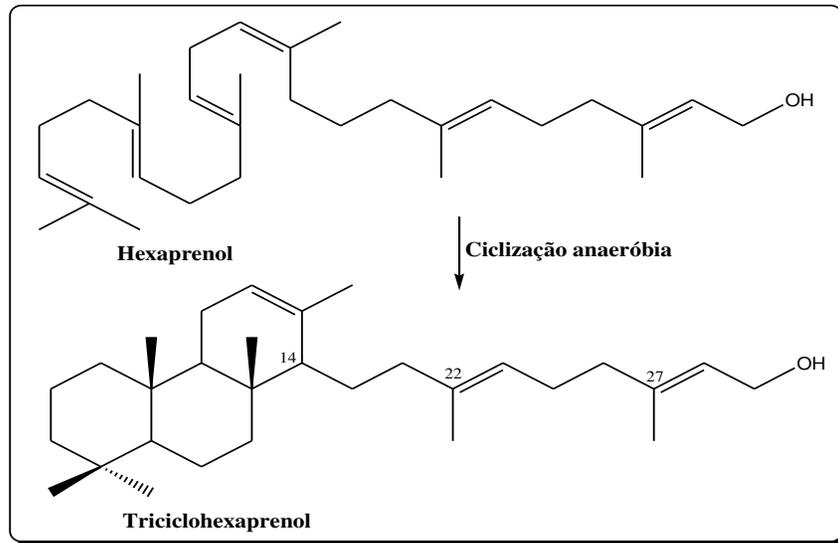


Figura 35. Ciclização anaeróbia de hexaprenol para gerar triciclohexaprenol, precursor dos terpanos tricíclicos.

Os terpanos tetracíclicos são menos abundantes que os tricíclicos e são relatados como sendo provenientes da degradação térmica e/ou biodegradação microbiana de hopanos através da quebra dos anéis **A** e **E**, gerando os Des-A-anel e os Des-E-anel (Trendel *et al.*, 1982) ou através da abertura do anel **C**, gerando os 8,14-seco-hopanos (Philp *et al.*, 1981) [Figura 36].

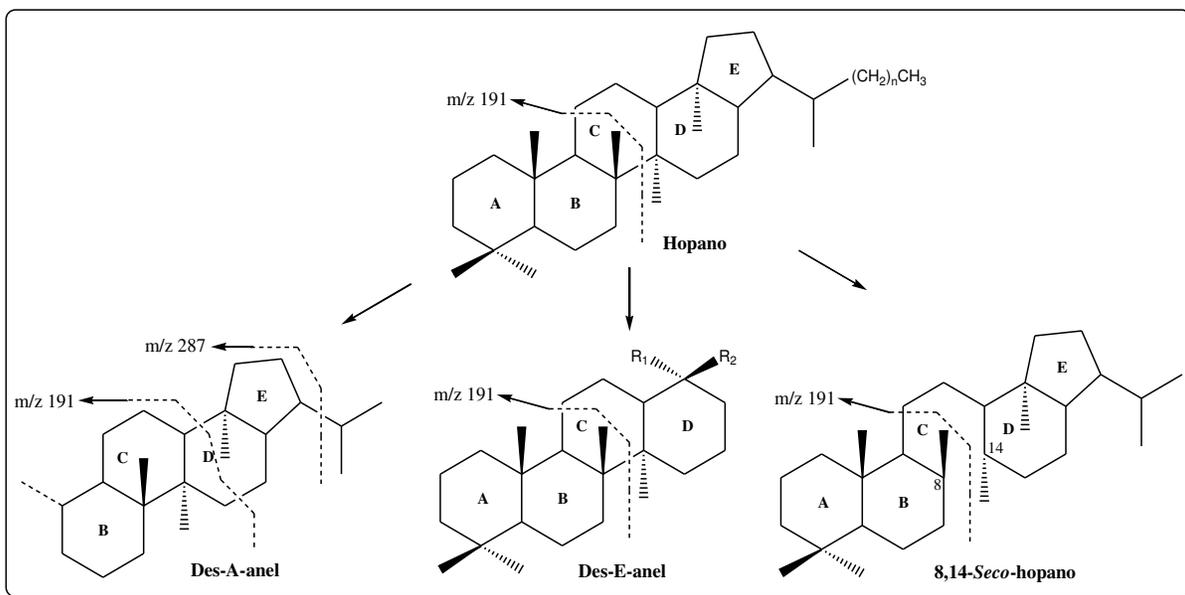


Figura 36. Terpanos tetracíclicos formados a partir da degradação de hopanos e seus fragmentos característicos.

Os terpanos pentacíclicos com esqueleto tipo hopanóide, tem como principal precursor o bacteriohopanotetrol [Figura 37] (Peters & Moldowan, 1993) e sua presença em amostras geológicas está associada à presença de bactérias metanotróficas, heterotróficas e cianobactérias (Simons & Kenig, 2003; Simoneit & Lein, 2004).

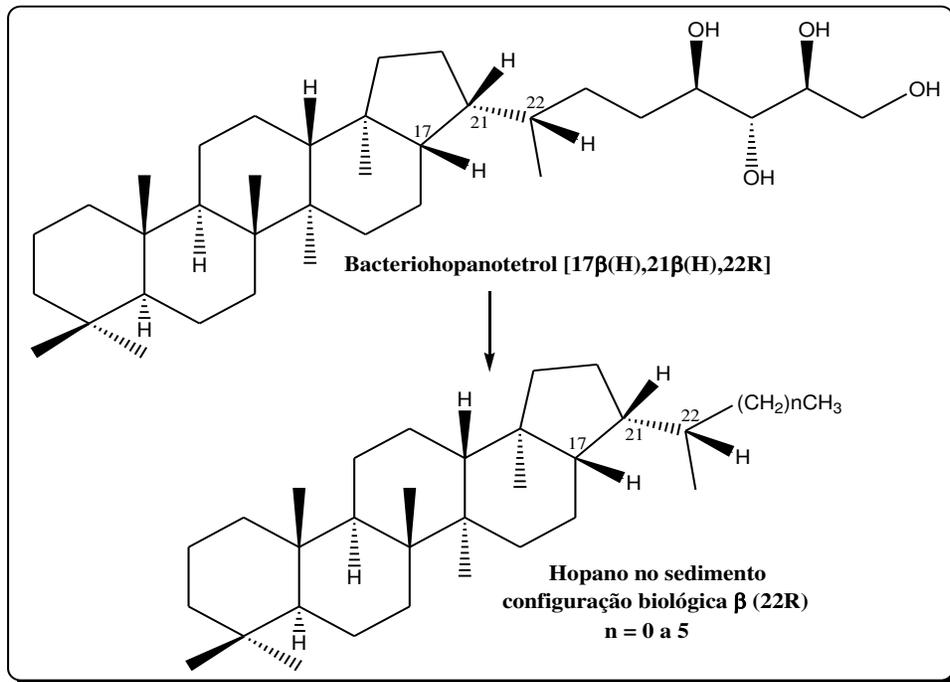


Figura 37. Estrutura do bacteriohopanotetrol – precursor de hopanos.

Todas estas classes de biomarcadores possuem o fragmento m/z 191 como principal íon característico e por isso, elas foram analisadas através do SIM m/z 191.

As **Figuras 38** e **39** ilustram os cromatogramas de íons extraídos (RIC) em m/z 191, evidenciando o incremento do processo de biodegradação, na presença dos consórcios aeróbios Co1 e Co2, respectivamente.

A **Tabela 14** apresenta a identificação dos terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos detectados através do SIM m/z 191, bem como o peso molecular e o índice de retenção calculado.

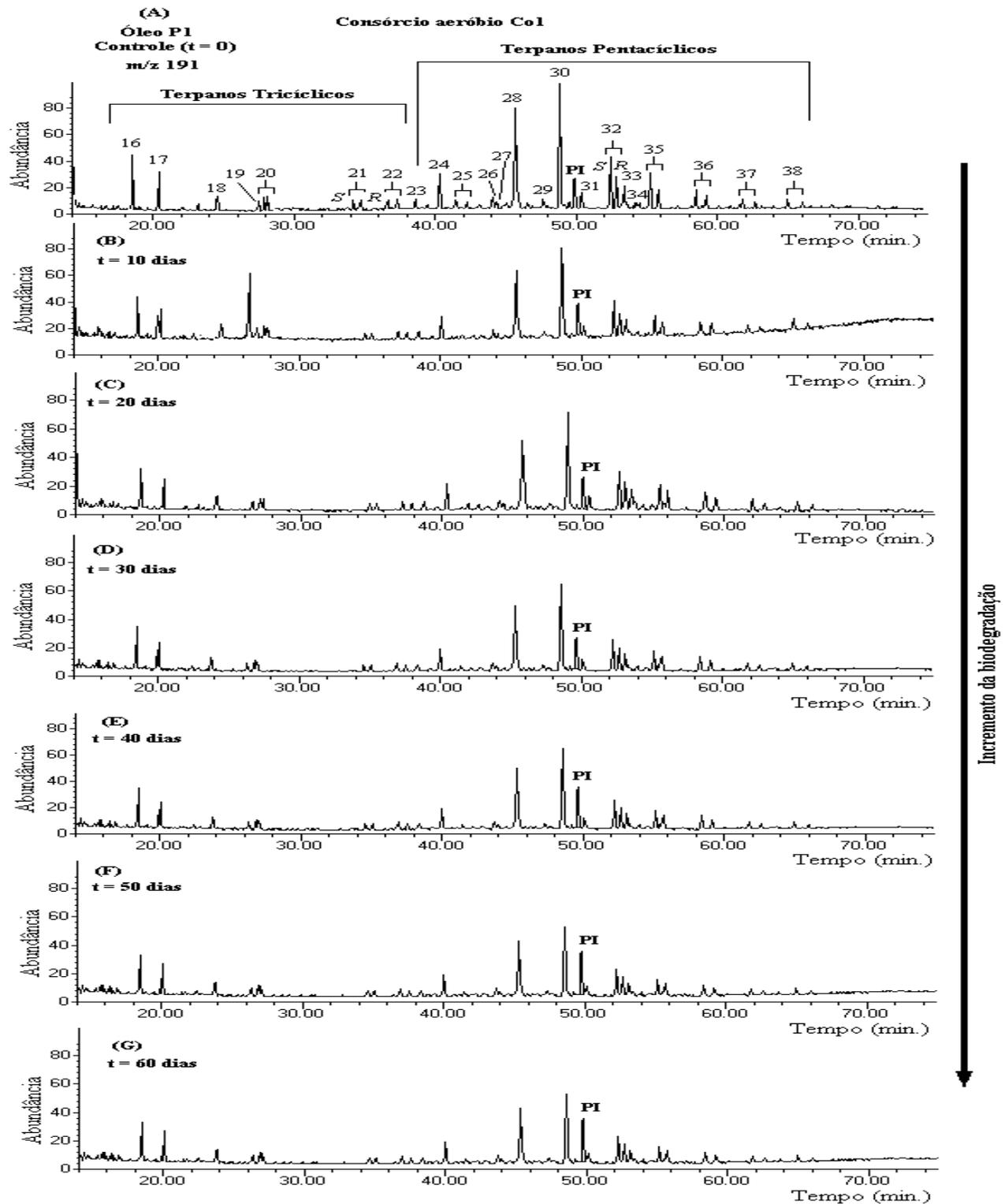


Figura 38. SIM m/z 191 mostrando a biodegradação de terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos pelo Co1 utilizando P1 disperso no meio. PI = Padrão Interno (5 α -colestan-3-ona).

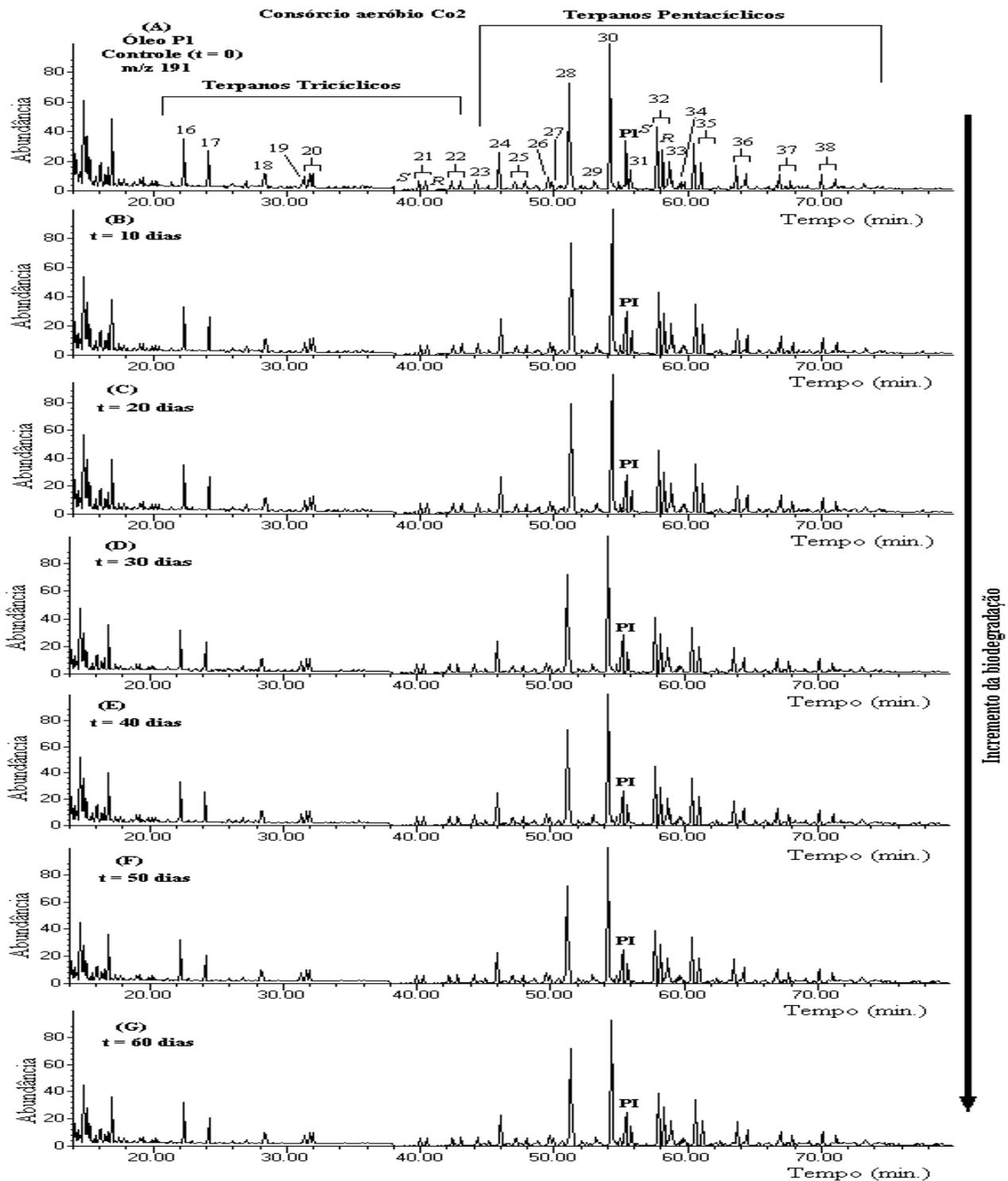


Figura 39. SIM m/z 191 mostrando a biodegradação de terpenos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos pelo Co2 utilizando P1 disperso no meio. PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

Tabela 14. Terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos analisados através do íon-fragmento em m/z 191

Pico	Composto	Fórmula	MM ^a	IR _C ^b	IR _L ^c
16	Tricíclico C ₂₃	C ₂₃ H ₄₂	318	2210	2202/2289
17	Tricíclico C ₂₄	C ₂₄ H ₄₄	332	2348	2356/2343
18	Tricíclico C ₂₅	C ₂₅ H ₄₆	346	2462	2470/2457
19	Tetracíclico C ₂₄	C ₂₆ H ₄₈	360	2510	2495/-
20S	Tricíclico C ₂₆ (S)	C ₂₄ H ₄₂	330	2545	-
20R	Tricíclico C ₂₆ (R)	C ₂₄ H ₄₂	330	2554	2553
21S	Tricíclico C ₂₈ (S)	C ₂₈ H ₅₂	388	2726	2716/2744
21R	Tricíclico C ₂₈ (R)	C ₂₈ H ₅₂	388	2754	2758/2757
22S	Tricíclico C ₂₉ (S)	C ₂₉ H ₅₄	402	2843	-/2802
22R	Tricíclico C ₂₉ (R)	C ₂₉ H ₅₄	402	2862	2890/2819
23	18 α (H)-22,29,30-trisnorhopano (Ts)	C ₂₇ H ₄₆	370	2861	2891/2864
24	17 α (H)-22,29,30-trisnorhopano (Tm)	C ₂₇ H ₄₆	370	2901	2934/2904
25S	Tricíclico C ₃₁ (S)	C ₃₁ H ₅₈	430	-	-
25R	Tricíclico C ₃₁ (R)	C ₃₁ H ₅₈	430	-	-
26	17 α (H),18 α (H),21 β (H)-28,30-bisnorhopano	C ₂₈ H ₄₈	384	3028	3033/-
27	17 α (H),21 β (H)-25-norhopano	C ₂₉ H ₅₀	398	3045	-/3043
28	17 α (H),21 β (H)-30-norhopano	C ₂₉ H ₅₀	398	3068	3075/-
29	17 β (H),21 α (H)-normoretano	C ₂₉ H ₅₀	398	3108	-
30	17 α (H),21 β (H)-30-hopano	C ₃₀ H ₅₂	412	3124	3163/3129
31	17 β (H),21 α (H)-30-moretano	C ₃₀ H ₅₂	412	3155	3185/3169
32S	17 α (H),21 β (H)-homohopano (22S)	C ₃₁ H ₅₄	426	3227	-
32R	17 α (H),21 β (H)-homohopano (22R)	C ₃₁ H ₅₄	426	3234	-
33	Gamacerano	C ₃₀ H ₅₂	412	3267	3303/-
34	17 β (H),21 α (H)-homomoretano	C ₃₁ H ₅₄	426	3288	-
35S	17 α (H),21 β (H)-bishomohopano (22S)	C ₃₂ H ₅₆	440	3310	-
35R	17 α (H),21 β (H)-bishomohopano (22R)	C ₃₁ H ₅₄	426	3360	-
36S	17 α (H),21 β (H)-trishomohopano (22S)	C ₃₃ H ₅₈	454	3407	-
36R	17 α (H),21 β (H)-trishomohopano (22R)	C ₃₃ H ₅₈	454	3419	-
37S	17 α (H),21 β (H)-tetrakishomohopano (22S)	C ₃₄ H ₆₀	468	3512	-
37R	17 α (H),21 β (H)-tetrakishomohopano (22R)	C ₃₄ H ₆₀	468	3528	-
38S	17 α (H),21 β (H)-pentakishomohopano (22S)	C ₃₅ H ₆₂	482	3612	-
38R	17 α (H),21 β (H)-pentakishomohopano (22R)	C ₃₅ H ₆₂	482	-	-

^aMM = Massa Molecular; ^bIR_C = Índice de retenção calculado; ^cIR_L = Índice de retenção da literatura (Lima, 2005; Rodrigues, 2000). De acordo com Lima (2000) IR para homohopano (22R+22S) = 3267; bishomohopano (22R+22S) = 3348; trishomohopano (22R+22S) = 3442; tetrakis e pentakishomohopano não foram determinados.

Os espectros de massas representativos para os terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos são mostrados na **Figura 40**.

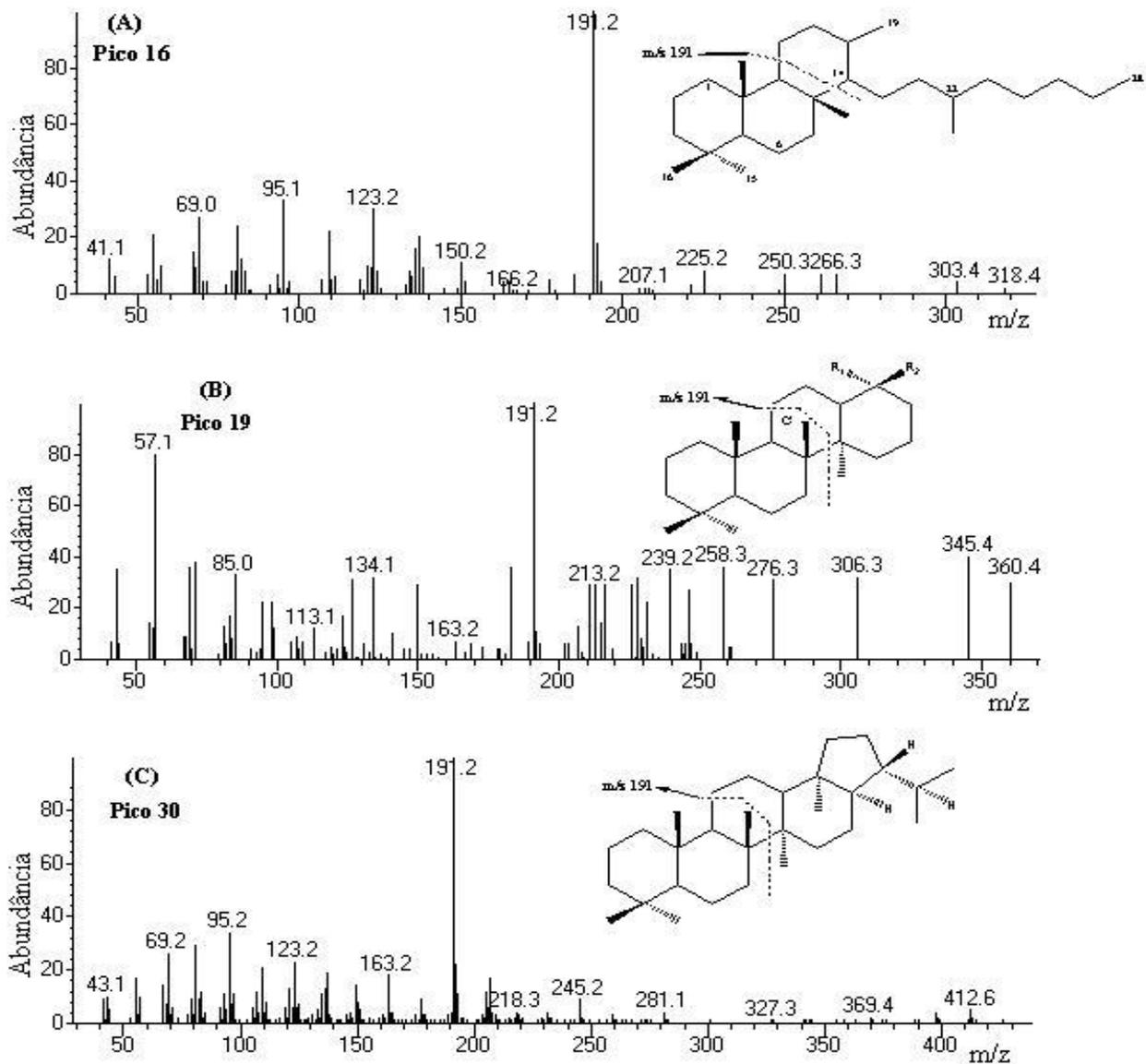


Figura 40. Espectros de massas para os terpanos (A) tricíclico C_{23} , **pico 16**, (B) tetracíclico C_{24} , **pico 19** e (C) pentacíclico C_{30} -hopano, **pico 30**.

Através da análise dos cromatogramas em m/z 191 [**Figuras 38 e 39**] observou-se a degradação preferencial de hopanos (**picos 30-38**, *Figuras 38 e 39*, págs. 89 e 90)

quando comparado aos terpanos tricíclicos (TT, **picos 16-18, 20-22 e 25**, Figuras 38 e 39, págs. 89 e 90 e Tabelas 15 e 16, págs. 97 e 99) para ambos os consórcios.

Em reservatórios, os TT C₁₉-C₄₅ são altamente resistentes a biodegradação e são removidos após os hopanos (Connan *et al.*, 1980) e ao mesmo tempo que os diasteranos (Sifert & Moldowan, 1979), porém, algumas exceções foram observadas utilizando experimentos em laboratório com culturas aeróbias. Recentes estudos reportaram a remoção de terpanos tricíclicos antes de hopanos, com degradação preferencial de ambos os epímeros *R* e *S* para TT C₂₈ em relação ao TT C₂₉ (Wang *et al.*, 2001; Bost *et al.*, 2001).

A degradação de hopanos, 25-norhopanos e esteranos tanto em reservatórios quanto em laboratório com culturas de microrganismos, envolve muitas discussões. Alguns estudos com óleos severamente biodegradados no reservatório mostram que os hopanos são removidos antes dos esteranos com formação de 25-norhopanos (Brooks *et al.*, 1988). Por outro lado, existem alguns relatos, também com óleos severamente biodegradados no reservatório, indicando que os hopanos são removidos após a quase total degradação dos esteranos sem formação de 25-norhopanos (Peters & Moldowan, 1993). Como exemplos, óleos do oeste da Sibéria, severamente biodegradados, mostraram degradação de 17 α (H)-hopanos com enriquecimento de 25-norhopanos e sem degradação de esteranos (Peters & Moldowan, 1991). Existem, também, exemplos de petróleos onde a degradação de hopanos e esteranos ocorreu simultaneamente, como é o caso das amostras de asfaltos de Malagasy que apresentaram 17 α (H)-hopanos, 25-norhopanos e esteranos parcialmente degradados (Rullkötter & Wendisch, 1982). Para simulações em laboratório, a suscetibilidade de biodegradação destes biomarcadores depende das condições do experimento e também da população microbiana utilizada (Peters & Moldowan, 1993). Por exemplo, sob condições aeróbias, Bost *et al.* (2001) mostrou que os hopanos são degradados sem produção de 25-norhopanos ou degradação de esteranos.

A origem de 25-norhopanos e seu enriquecimento em alguns óleos severamente biodegradados estão associados a três possíveis hipóteses (Peters *et al.*, 2005):

1 - Alguns microrganismos produzem 25-norhopanos, hopanos e seus precursores biológicos. Neste caso, a biodegradação severa remove os hopanos com conseqüente enriquecimento de 25-norhopanos [**Figura 41**];

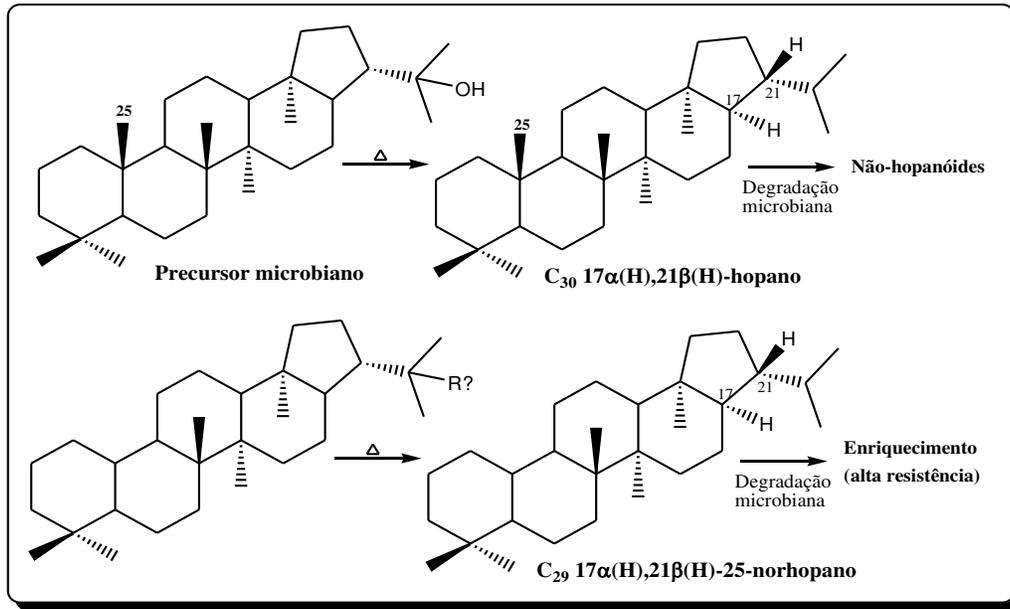


Figura 41. Primeira hipótese sugerida para origem de 25-norhopanos (Peters *et al.*, 2005).

2 - Os 25-norhopanos são originados através da remoção da metila em C₁₀ dos hopanos devido ao ataque microbiano [

Figura 42];

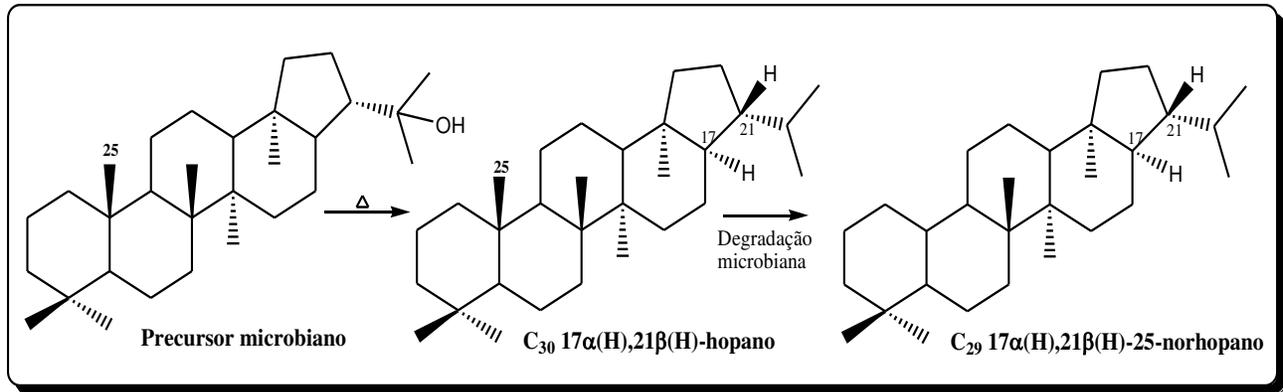


Figura 42. Segunda hipótese sugerida para origem de 25-norhopanos (Peters *et al.*, 2005).

3 – Existem diferentes grupos de microrganismos no reservatório. Aqueles que estão presentes na formação da matéria orgânica sedimentar, não produzem 25-norhopanos ou seu precursor biológico. E aqueles que são efetivamente responsáveis pela biodegradação de petróleo produzem 25-norhopanos e não degradam hopanos [Figura 43].

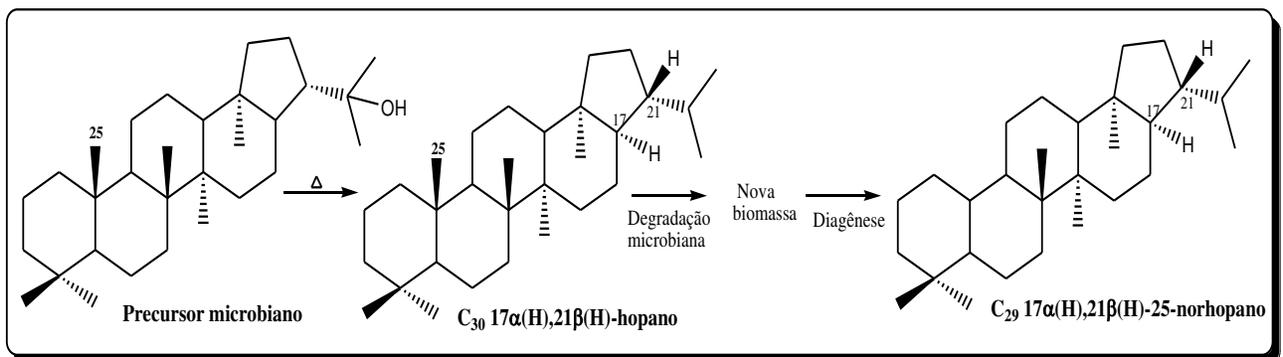


Figura 43. Terceira hipótese sugerida para origem de 25-norhopanos (Peters *et al.*, 2005).

A biodegradação de C_{31} - C_{35} homohopanos também causa controvérsias. Em muitos óleos biodegradados no reservatório que possuem 17 α -hopanos e 25-norhopanos conservados, não se observa biodegradação preferencial de homohopanos individuais (Chosson *et al.*, 1992). Entretanto em simulações feitas em laboratório existem vários trabalhos que relatam a degradação destes compostos, como por

exemplo, Goodwin *et al.* (1983) mostraram a degradação preferencial de homohopanos de alto peso molecular após 11,5 meses, enquanto Munoz *et al.* (1997) mostrou 25 % de degradação para C₃₅ pentaquishomohopano e apenas 3 % para C₃₁ homohopano em amostras de solos contaminadas com óleo, durante oito anos.

Baseado em todas estas discussões, avaliou-se a extensão da biodegradação para os terpanos tricíclicos, tetracíclicos, hopanos e 25-norhopanos utilizando 5 α -colestano-3-ona como padrão interno de quantificação. As concentrações e as taxas de biodegradação para TT C₂₃-C₃₁ (**picos 16-18, 20-22 e 25**, *Figuras 38 e 39, págs. 89 e 90*) hopanos e homohopanos C₃₀-C₃₅ (**picos 30-38**, *Figuras 38 e 39*) são mostradas nas **Tabelas 15 e 16** com Co1 e Co2, respectivamente.

Tabela 15. Concentração ($\mu\text{g/g F1}$) e TB (%) para terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos em m/z 191 com consórcio Co1

Picos	Concentração ($\mu\text{g/g F1}$) / TB (%) ^a						
	Tempo (dias)						
	0	10	20	30	40	50	60
16	33,0 \pm 3,0	28,3 / 14 \pm 2,5	28,0 / 15 \pm 2,7	28,0 / 15 \pm 1,2	27,7 / 16 \pm 1,8	27,6 / 16 \pm 3,4	27,6 / 16 \pm 2,4
17	16,5 \pm 1,0	13,5 / 18 \pm 1,5	13,5 / 18 \pm 1,5	13,3 / 19 \pm 2,5	13,1 / 21 \pm 3,2	13,1 / 21 \pm 2,6	13,0 / 21 \pm 1,1
18	5,9 \pm 2,7	5,7 / 4 \pm 1,8	5,6 / 5 \pm 3,6	5,6 / 5 \pm 2,0	5,4 / 8 \pm 1,4	5,4 / 8 \pm 1,1	4,8 / 19 \pm 1,4
19	4,8 \pm 3,8	4,8 / 0 \pm 2,9	4,8 / 0 \pm 1,9	4,6 / 4 \pm 1,9	4,5 / 6 \pm 2,9	4,5 / 6 \pm 1,0	4,0 / 17 \pm 1,5
20S	6,0 \pm 3,2	5,8 / 3 \pm 0,0	5,6 / 7 \pm 1,7	5,4 / 10 \pm 2,4	5,0 / 17 \pm 3,1	4,9 / 18 \pm 1,8	4,8 / 20 \pm 1,9
20R	6,1 \pm 0,8	6,0 / 2 \pm 1,8	6,0 / 2 \pm 2,6	5,7 / 7 \pm 2,7	5,5 / 10 \pm 3,8	5,4 / 11 \pm 2,0	4,8 / 21 \pm 2,0
21S	5,3 \pm 2,1	5,0 / 6 \pm 1,9	4,8 / 9 \pm 1,5	4,6 / 13 \pm 1,4	4,4 / 17 \pm 1,5	4,4 / 17 \pm 1,6	4,2 / 21 \pm 1,2
21R	5,9 \pm 2,6	4,9 / 17 \pm 1,9	4,9 / 17 \pm 2,5	4,8 / 19 \pm 1,2	4,7 / 20 \pm 2,3	4,6 / 22 \pm 3,1	4,6 / 22 \pm 1,0
22S	4,9 \pm 2,4	4,5 / 8 \pm 1,4	4,2 / 14 \pm 1,8	4,2 / 14 \pm 2,3	4,2 / 14 \pm 2,0	4,1 / 16 \pm 1,7	4,1 / 16 \pm 1,2
22R	5,2 \pm 2,4	4,9 / 6 \pm 2,0	4,6 / 12 \pm 2,6	4,5 / 13 \pm 1,4	4,4 / 15 \pm 2,2	4,3 / 17 \pm 1,7	4,3 / 17 \pm 1,5
23	5,4 \pm 1,6	5,3 / 2 \pm 0,9	5,3 / 2 \pm 1,2	4,9 / 9 \pm 1,4	4,8 / 11 \pm 1,8	4,2 / 22 \pm 1,7	4,0 / 26 \pm 1,2
24	15,6 \pm 2,7	14,8 / 5 \pm 3,8	13,7 / 12 \pm 1,4	13,4 / 14 \pm 2,5	13,0 / 17 \pm 1,0	12,4 / 21 \pm 2,2	11,4 / 27 \pm 1,7
25S	4,5 \pm 2,0	4,4 / 2 \pm 3,1	4,4 / 2 \pm 2,2	4,2 / 7 \pm 1,9	4,1 / 9 \pm 1,9	4,1 / 9 \pm 1,9	4,0 / 11 \pm 1,9
25R	4,8 \pm 1,5	4,6 / 4 \pm 1,4	4,4 / 8 \pm 1,7	4,4 / 8 \pm 2,2	4,2 / 13 \pm 1,7	4,2 / 13 \pm 1,0	4,1 / 15 \pm 1,2
26	4,6 \pm 1,7	4,4 / 4 \pm 1,9	4,4 / 4 \pm 3,8	4,0 / 13 \pm 3,1	3,8 / 17 \pm 2,2	3,6 / 22 \pm 1,7	nd ^b
27	3,8 \pm 1,9	3,7 / 2 \pm 2,2	3,7 / 2 \pm 1,4	3,8 / 0 \pm 2,5	2,9 / 24 \pm 3,1	2,8 / 26 \pm 3,8	nd
28	70,2 \pm 2,2	69,8 / <1 \pm 2,0	69,6 / <1 \pm 2,7	55,8 / 21 \pm 1,7	52,1 / 26 \pm 1,9	48,6 / 31 \pm 1,7	34,5 / 51 \pm 1,7
29	4,0 \pm 1,4	3,8 / 5 \pm 1,4	3,8 / 5 \pm 1,9	3,6 / 10 \pm 1,4	nd	nd	nd

30	120,0 ± 1,9	108,0 / 10 ± 3,1	92,4 / 23 ± 1,7	88,6 / 26 ± 1,9	86,2 / 28 ± 3,8	44,7 / 63 ± 2,7	13,6 / 89 ± 3,8
31	10,2 ± 1,4	10,0 / 2 ± 2,2	8,6 / 16 ± 1,5	6,2 / 39 ± 2,0	4,3 / 58 ± 1,9	nd	nd
32S	34,2 ± 2,5	29,4 / 14 ± 1,9	29,0 / 15 ± 1,9	29,0 / 15 ± 2,2	24,2 / 29 ± 1,4	20,4 / 40 ± 2,0	6,4 / 81 ± 1,5
32R	13,9 ± 1,7	11,5 / 17 ± 1,4	10,3 / 26 ± 2,7	8,6 / 38 ± 1,7	7,4 / 47 ± 1,7	6,2 / 55 ± 1,5	2,1 / 84 ± 0,9
33	12,8 ± 1,4	10,6 / 17 ± 1,5	8,4 / 34 ± 0,2	7,5 / 41 ± 0,9	5,8 / 55 ± 3,1	3,6 / 72 ± 2,0	1,8 / 86 ± 4,0
34	3,8 ± 2,2	2,6 / 32 ± 2,6	1,8 / 53 ± 2,0	nd	nd	nd	nd
35S	15,2 ± 1,0	8,6 / 43 ± 0,8	7,8 / 49 ± 1,2	4,5 / 70 ± 3,4	3,8 / 75 ± 2,4	2,9 / 81 ± 1,3	1,9 / 88 ± 0,8
35R	12,7 ± 1,1	5,8 / 54 ± 2,0	5,4 / 57 ± 3,2	3,1 / 76 ± 0,9	2,6 / 80 ± 2,5	1,8 / 86 ± 2,2	1,6 / 87 ± 0,9
36S	12,6 ± 2,2	7,3 / 42 ± 2,1	6,0 / 52 ± 1,0	4,8 / 62 ± 0,1	3,6 / 71 ± 1,6	2,6 / 79 ± 1,1	1,6 / 87 ± 3,1
36R	6,2 ± 1,8	3,1 / 50 ± 2,3	2,8 / 55 ± 2,4	2,3 / 63 ± 6,1	0,8 / 87 ± 1,8	0,7 / 88 ± 4,3	0,7 / 88 ± 5,0
37S	4,8 ± 1,3	4,0 / 17 ± 4,1	4,2 / 13 ± 3,2	3,4 / 29 ± 0,9	2,1 / 56 ± 2,4	1,2 / 75 ± 2,1	nd
37R	3,2 ± 1,4	2,1 / 34 ± 1,5	1,2 / 63 ± 2,2	0,8 / 75 ± 1,8	nd	nd	nd
38S	4,1 ± 3,1	3,7 / 10 ± 1,1	2,6 / 37 ± 0,9	2,1 / 49 ± 2,0	1,4 / 66 ± 3,1	0,8 / 80 ± 1,4	nd
38R	2,8 ± 0,9	2,4 / 14 ± 0,4	1,1 / 61 ± 0,2	0,5 / 82 ± 1,0	nd	nd	nd

^aMédia de duplicata, desvio padrão (n=2); ^bnd = não determinado (composto ausente).

Tabela 16. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos em m/z 191 com consórcio Co2

Picos	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%) ^a						
	Tempo (dias)						
	0	10	20	30	40	50	60
16	33,0 \pm 3,0	28,8 / 15 \pm 2,0	28,6 / 13 \pm 1,7	28,1 / 15 \pm 1,0	27,9 / 15 \pm 1,2	27,7 / 16 \pm 1,4	27,7 / 16 \pm 0,9
17	16,5 \pm 1,0	13,8 / 16 \pm 1,0	13,7 / 17 \pm 0,5	13,5 / 18 \pm 1,5	13,3 / 19 \pm 2,2	13,2 / 20 \pm 2,1	13,1 / 21 \pm 1,8
18	5,9 \pm 2,7	5,8 / 2 \pm 1,6	5,7 / 3 \pm 2,6	5,6 / 5 \pm 1,0	5,6 / 5 \pm 1,0	5,4 / 8 \pm 0,9	5,0 / 15 \pm 2,4
19	4,8 \pm 3,8	4,7 / 2 \pm 0,9	4,7 / 2 \pm 1,9	4,6 / 4 \pm 1,7	4,6 / 4 \pm 2,2	4,5 / 6 \pm 1,0	4,3 / 11 \pm 1,3
20S	6,0 \pm 3,2	5,8 / 3 \pm 0,6	5,7 / 5 \pm 1,2	5,7 / 5 \pm 2,3	5,3 / 12 \pm 2,1	5,0 / 17 \pm 1,6	4,9 / 18 \pm 1,3
20R	6,1 \pm 0,8	5,9 / 3 \pm 1,3	5,9 / 3 \pm 1,6	5,8 / 5 \pm 2,5	5,6 / 8 \pm 2,8	5,5 / 10 \pm 1,0	4,9 / 20 \pm 0,9
21S	5,3 \pm 2,1	5,2 / 2 \pm 1,2	5,0 / 6 \pm 1,2	4,8 / 9 \pm 1,1	4,6 / 13 \pm 1,0	4,5 / 15 \pm 1,3	4,3 / 19 \pm 0,6
21R	5,9 \pm 2,6	5,6 / 5 \pm 1,2	5,2 / 12 \pm 1,5	5,0 / 15 \pm 1,0	4,8 / 19 \pm 1,3	4,7 / 20 \pm 2,1	4,6 / 22 \pm 0,8
22S	4,9 \pm 2,4	4,7 / 4 \pm 1,6	4,5 / 8 \pm 0,8	4,4 / 10 \pm 1,3	4,3 / 12 \pm 1,0	4,3 / 12 \pm 1,5	4,0 / 18 \pm 0,6
22R	5,2 \pm 2,4	5,0 / 4 \pm 1,0	4,8 / 8 \pm 2,1	4,6 / 12 \pm 1,2	4,5 / 13 \pm 2,0	4,5 / 13 \pm 1,0	4,2 / 19 \pm 0,9
23	5,4 \pm 1,6	5,2 / 4 \pm 0,8	5,2 / 4 \pm 1,2	5,0 / 7 \pm 1,6	4,9 / 9 \pm 1,2	4,4 / 19 \pm 1,3	4,2 / 22 \pm 2,2
24	15,6 \pm 2,7	15,0 / 4 \pm 2,8	14,4 / 8 \pm 1,0	13,8 / 12 \pm 2,1	13,4 / 14 \pm 1,9	12,6 / 19 \pm 2,1	11,2 / 28 \pm 1,5
25S	4,5 \pm 2,0	4,4 / 2 \pm 2,1	4,4 / 2 \pm 2,0	4,3 / 4 \pm 1,2	4,2 / 7 \pm 1,1	4,1 / 9 \pm 1,2	4,1 / 9 \pm 1,9
25R	4,8 \pm 1,5	4,7 / 2 \pm 1,0	4,5 / 6 \pm 1,3	4,5 / 6 \pm 2,6	4,3 / 10 \pm 0,7	4,2 / 13 \pm 0,9	4,2 / 13 \pm 1,2
26	4,6 \pm 1,7	4,6 / 0 \pm 1,4	4,6 / 0 \pm 2,2	4,6 / 0 \pm 3,1	4,7 / 2 \pm 2,5	4,7 / 2 \pm 1,7	5,0 / 9 \pm 3,8
27	3,8 \pm 1,9	3,8 / 0 \pm 3,8	3,8 / 0 \pm 1,9	3,8 / 0 \pm 2,2	3,9 / 3 \pm 3,1	3,9 / 3 \pm 1,9	4,0 / 5 \pm 1,7
28	70,2 \pm 2,2	70,0 / <1 \pm 1,9	69,8 / <1 \pm 1,4	65,8 / 6 \pm 2,2	54,9 / 22 \pm 1,4	46,2 / 34 \pm 1,9	38,6 / 45 \pm 1,4
29	4,0 \pm 1,4	3,8 / 5 \pm 2,7	3,8 / 5 \pm 2,0	3,7 / 8 \pm 1,9	3,4 / 15 \pm 1,7	3,0 / 25 \pm 1,7	2,8 / 30 \pm 1,7

30	120,0 ± 1,9	116,0 / 3 ± 1,5	111,5 / 7 ± 2,2	91,6 / 24 ± 1,9	88,4 / 26 ± 2,0	48,7 / 59 ± 1,4	16,9 / 86 ± 2,5
31	10,2 ± 1,4	10,0 / 2 ± 1,7	9,4 / 8 ± 3,1	8,0 / 22 ± 3,8	5,3 / 48 ± 1,9	4,2 / 59 ± 3,8	3,4 / 67 ± 2,7
32S	34,2 ± 2,5	32,0 / 6 ± 2,7	32,0 / 6 ± 1,4	32,0 / 6 ± 1,7	31,3 / 8 ± 1,7	30,2 / 12 ± 0,9	8,6 / 75 ± 1,5
32R	13,9 ± 1,7	12,3 / 12 ± 1,9	12,1 / 12 ± 1,9	11,2 / 19 ± 1,4	10,4 / 25 ± 2,2	8,9 / 36 ± 1,5	4,8 / 65 ± 2,0
33	12,8 ± 1,4	10,7 / 16 ± 2,0	9,1 / 29 ± 2,6	8,5 / 34 ± 1,4	6,2 / 52 ± 1,7	4,1 / 68 ± 2,2	2,2 / 83 ± 4,0
34	3,8 ± 2,2	3,6 / 5 ± 0,2	2,8 / 26 ± 1,5	2,4 / 37 ± 3,1	1,8 / 53 ± 0,9	1,6 / 58 ± 2,0	nd ^b
35S	15,2 ± 1,0	9,4 / 38 ± 3,2	9,4 / 38 ± 2,0	9,0 / 40 ± 2,5	8,9 / 41 ± 0,9	8,6 / 43 ± 0,9	3,1 / 79 ± 2,2
35R	12,7 ± 1,1	6,7 / 47 ± 1,2	6,4 / 50 ± 0,8	4,2 / 67 ± 2,4	3,8 / 70 ± 3,4	3,1 / 76 ± 0,8	2,6 / 80 ± 1,3
36S	12,6 ± 2,2	8,2 / 35 ± 2,4	7,1 / 44 ± 2,3	5,2 / 59 ± 1,8	4,2 / 67 ± 1,6	3,3 / 74 ± 5,0	1,8 / 86 ± 4,3
36R	6,2 ± 1,8	3,0 / 52 ± 1,0	3,0 / 52 ± 2,1	2,7 / 56 ± 6,1	1,4 / 77 ± 0,1	1,0 / 84 ± 2,2	0,8 / 87 ± 3,1
37S	4,8 ± 1,3	4,0 / 17 ± 2,2	4,0 / 17 ± 1,8	3,7 / 23 ± 0,2	2,6 / 46 ± 2,1	1,8 / 63 ± 1,1	1,6 / 67 ± 1,4
37R	3,2 ± 1,4	3,0 / 6 ± 1,1	2,7 / 16 ± 2,0	1,9 / 41 ± 1,5	1,4 / 56 ± 1,4	1,1 / 66 ± 3,1	nd
38S	4,1 ± 3,1	3,9 / 5 ± 3,2	3,8 / 7 ± 0,4	3,4 / 17 ± 4,1	2,6 / 37 ± 3,1	1,6 / 61 ± 1,8	nd
38R	2,8 ± 0,9	2,6 / 7 ± 0,9	2,1 / 25 ± 0,9	1,1 / 61 ± 1,0	1,0 / 64 ± 1,3	0,8 / 71 ± 2,4	nd

^aMédia de duplicata, desvio padrão (n=2); ^bnd = não determinado (composto ausente).

A partir da análise dos dados observou-se que os TT C₂₃-C₃₁ (**picos 16-18, 20-22 e 25**, Figuras 38 e 39, págs. 89 e 90, Tabelas 14, 15 e 16 págs. 91, 97 e 99) permaneceram quase inalterados para ambos os consórcios com taxas de biodegradação de 0 a 22 %, mostrando a alta resistência destes compostos comparado aos hopanos (**picos 30-38**, Figuras 38 e 39). Tanto Co1 quanto Co2 degradaram ambos os epímeros *R* e *S* com uma leve preferência pelo *R*. O 17 α (H),21 β (H)-30-hopano (**pico 30**) foi mais biodegradado pelo Co1 (51 %) que pelo Co2 (45 %). A degradação de homohopano C₃₁-C₃₅ (**picos 32 e 35-38**) foi mais pronunciada para ambos os consórcios quando comparada aos terpanos tricíclicos e hopano C₃₀ com degradação preferencial dos epímeros 22*R* de maior peso molecular [C₃₅ > C₃₄ > C₃₃ > C₃₂ > C₃₁] [**Tabelas, 15 e 16**]. Estes dados também são suportados pelos cálculos das razões entre tricíclicos e hopanos (razões TT) e pelo índice de homohopano (IH) [**Tabela 44**, pág. 219], uma vez que as razões C₂₈ e C₂₉ TT/C₃₅H aumentaram e o índice de homohopano diminuiu com o progresso da biodegradação, revelando mais uma vez a remoção preferencial do hopano C₃₅ em condições aeróbias [**Tabela 44**].

Os compostos C₂₅-, C₂₈- e C₃₀-norhopanos (NH) [**Figura 44**], também chamados de hopanos desmetilados, são, principalmente, considerados como provenientes da biodegradação microbiana dos hopanos pela perda da metila dos carbonos C₁₀, C₁₈ e C₂₂, respectivamente, e são detectados após biodegradação das parafinas (Peters, *et al.*, 2005; Lopes, *et al.*, 1999).

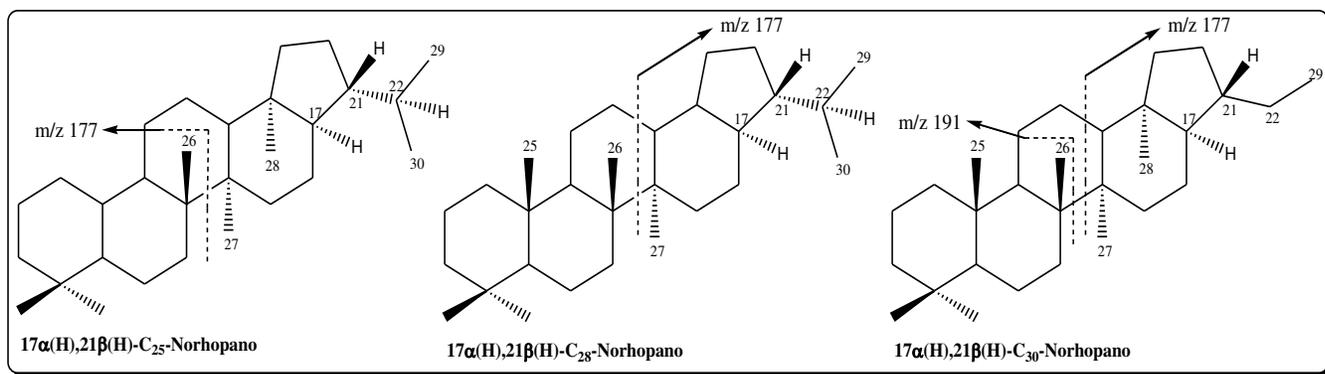


Figura 44. Estruturas e principais fragmentos dos compostos terpanos pentacíclicos C₂₅-, C₂₈- e C₃₀-norhopanos.

Neste trabalho monitorou-se a presença da série de norhopanos (NH) através dos íons-fragmentos m/z 191 [Figuras 38 e 39, págs. 89 e 90] e m/z 177 [Figuras 45 e 46].

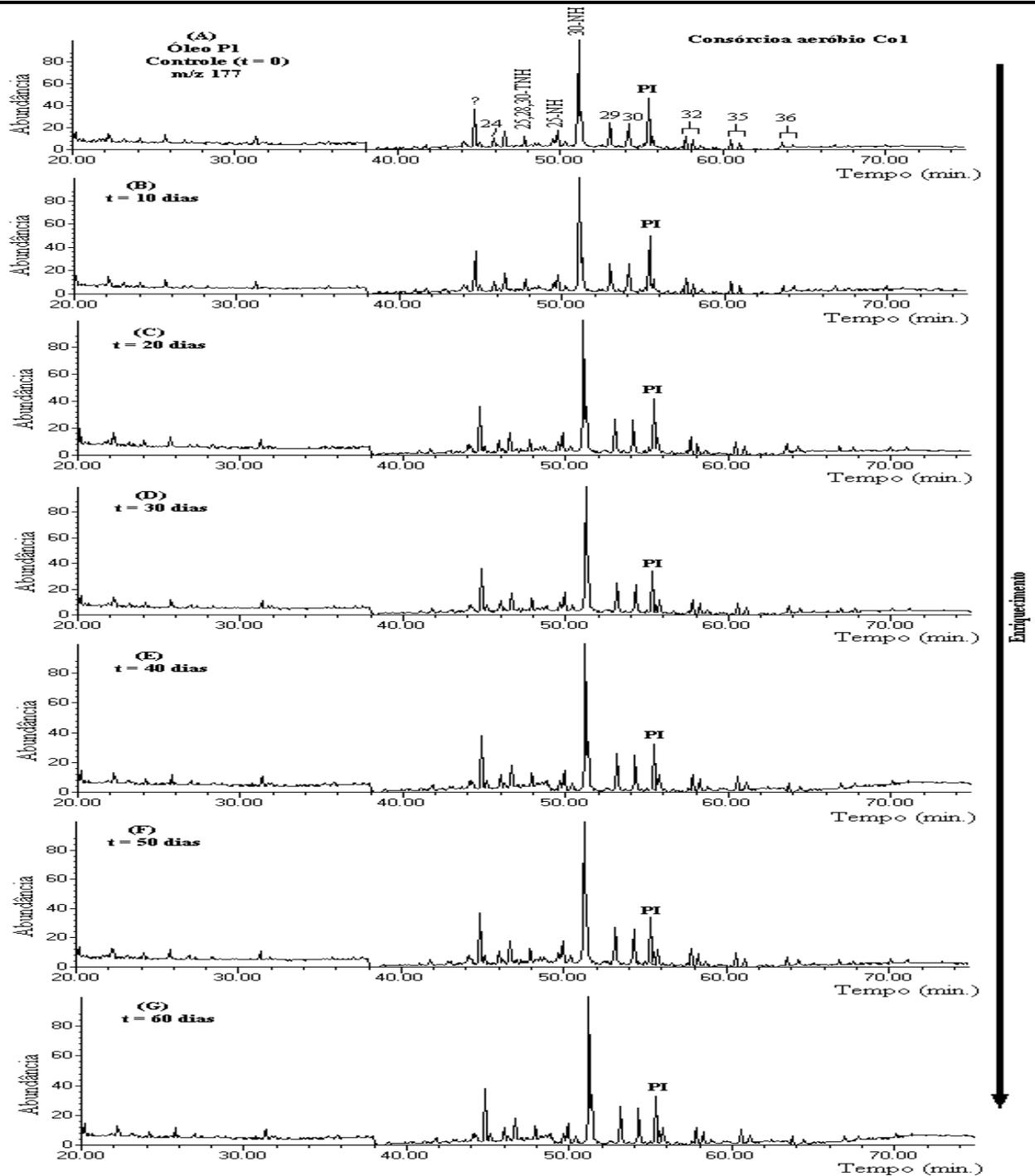


Figura 45. SIM m/z 177 mostrando o leve enriquecimento de norhopanos pelo Co1 utilizando PI disperso no meio durante 60 dias de monitoramento. 25,28,30-TNH = $17\alpha(H),18\alpha(H),21\beta(H)$ -25,28,30-trisnorhopano; 25-NH = $17\alpha(H),21\beta(H)$ -25-norhopano; 30-NH = $17\alpha(H),21\beta(H)$ -30-norhopano; ? = composto não identificado; PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

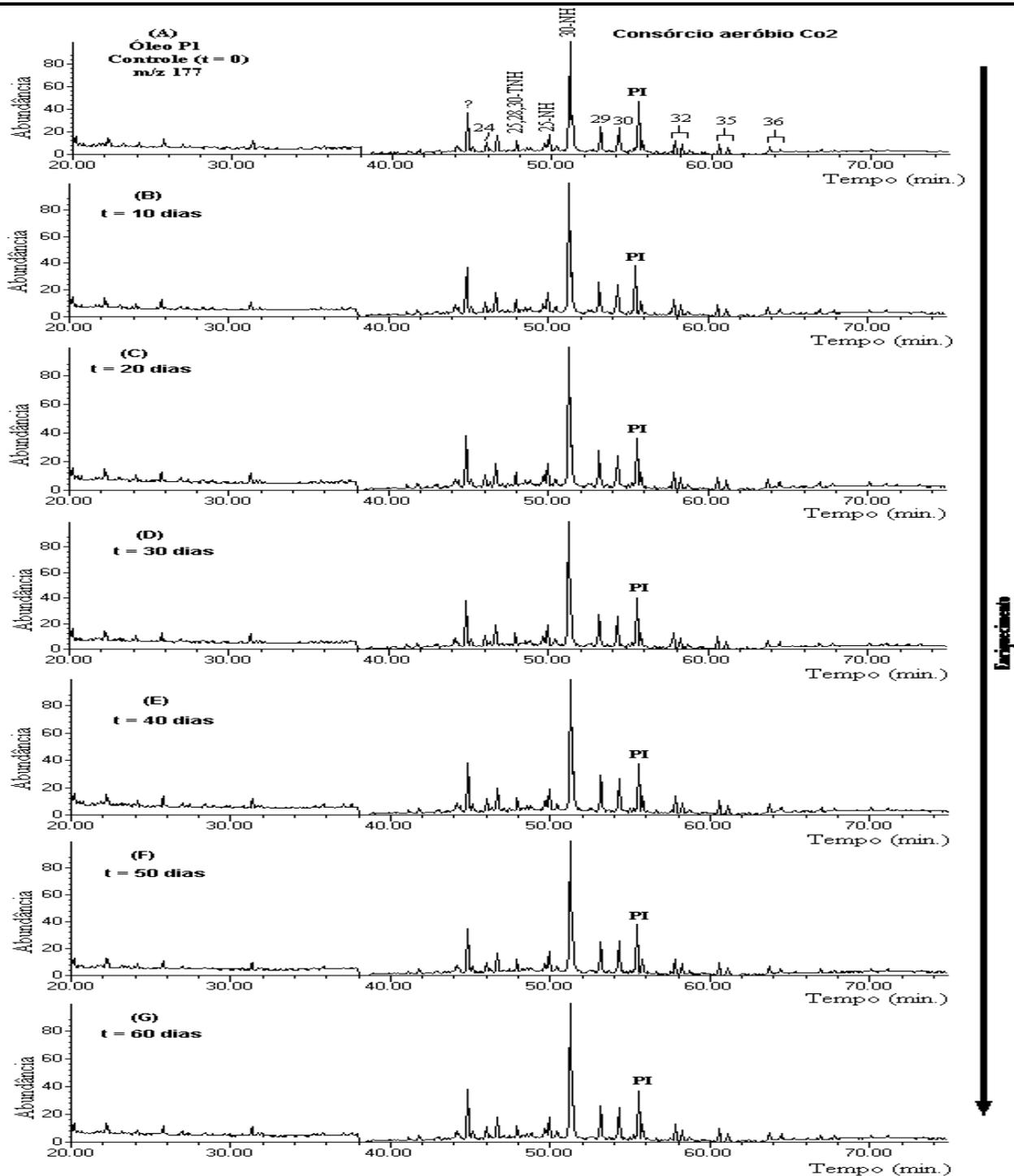


Figura 46. SIM m/z 177 mostrando o leve enriquecimento de norhopanos pelo Co₂ utilizando PI disperso no meio durante 60 dias de monitoramento. 25,28,30-TNH = 17 α (H),18 α (H),21 β (H)-25,28,30-trisnorhopano; 25-NH = 17 α (H),21 β (H)-25-norhopano; 30-NH = 17 α (H),21 β (H)-30-norhopano; ? = composto não identificado; PI = Padrão Interno (5 α -colestano-3-ona).

É importante considerar que os compostos 25,28,30-trisnorhopano (25,28,30-TNH, Figuras 45 e 46, págs. 103 e 104) e 28,30-bisnorhopano (28,30-BNH) (Pico 26, Figuras 38 e 39, págs. 89 e 90) só são perceptíveis quando monitorados pelos íons m/z 177 [Figuras 45 e 46, págs. 103 e 104] e m/z 191 [Figuras 38 e 39, págs. 89 e 90], respectivamente. Isto é devido à maior estabilidade do íon-fragmento m/z 177 quando comparado ao íon-fragmento m/z 191 para 25,28,30-TNH e vice-versa para o 28,30-BNH. De acordo com a literatura (Seifert *et al.*, 1978), o 28,30-BNH é encontrado em ambientes deposicionais marinhos anóxicos e pode ser proveniente da degradação anaeróbia de petróleo.

A Tabela 17 apresenta a concentração em $\mu\text{g/g}$ F1 para a série de norhopanos detectados após 60 dias de monitoramento para ambos os consórcios.

Tabela 17. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) mostrando o enriquecimento, para a série de norhopanos detectados através do SIM m/z 191 e 177 com os consórcios aeróbios Co1 e Co2

Picos	Compostos	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) (controle, $t = 0$)	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) ($t = 60$ dias)	
			Co1	Co2
- ^a	17 α (H),18 α (H),21 β (H)- 25,28,30-trisnorhopano	3,7 \pm 2,3	4,6 \pm 2,1	4,4 \pm 2,2
26 ^b	17 α (H),18 α (H),21 β (H)- 28,30-bisnorhopano	4,6 \pm 1,7	5,1 \pm 0,9	5,2 \pm 1,4
27 ^c	17 α (H),21 β (H)-25-norhopano	3,8 \pm 1,9	4,6 \pm 1,2	4,8 \pm 1,4
28 ^d	17 α (H),21 β (H)-30-norhopano	70,2 \pm 2,2	90,1 \pm 1,4	88,2 \pm 1,3
29 ^e	17 β (H),21 α (H)-normoretano	4,0 \pm 1,4	4,9 \pm 1,2	4,7 \pm 2,0

^a17 α (H),18 α (H),21 β (H)-25,28,30-trisnorhopano em m/z 177 (Figuras 45 e 46); ^b17 α (H),18 α (H),21 β (H)-28,30-bisnorhopano em m/z 191 (Figuras 38 e 39); ^c17 α (H),21 β (H)-25-norhopano em m/z 191 e 177; ^d17 α (H),21 β (H)-30-norhopano em m/z 191 e 177; ^e17 β (H),21 α (H)-normoretano em m/z 191 e 177.

Através da análise dos resultados obtidos, observa-se que houve um enriquecimento relativo de 11 a 28 % para a série quando Co1 estava presente e de 13 a 26 % quando Co2 foi utilizado. Entretanto estes resultados não são suficientes para definir a origem dos 25-norhopanos uma vez que o aumento da abundância destes compostos com concomitante diminuição dos hopanos durante a biodegradação é consistente com as três hipóteses existentes [Figuras 42, 43 e 44 págs. 95 e 102].

O cálculo da razão 25-NH revelou um progressivo aumento ao longo do processo de biodegradação mostrando a alta resistência destes compostos à ação dos microrganismos em relação aos hopanos [Tabela 44, pág. 219].

A Figura 47 mostra os espectros de massas representativos para o $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})\text{-C}_{25}\text{-norhopano}$ (pico 27) e $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})\text{-C}_{30}\text{-norhopano}$ (pico 28).

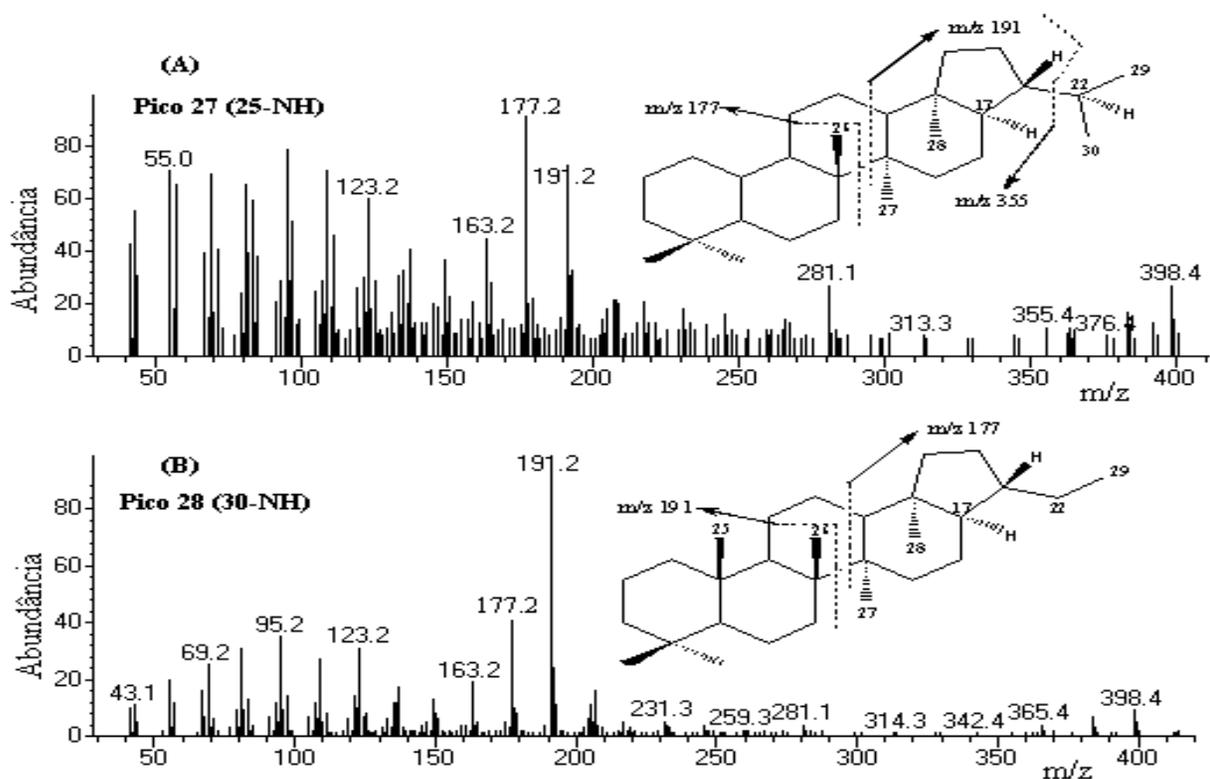


Figura 47. Espectros de massas para os norhopanos (A) $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})\text{-C}_{25}\text{-norhopano}$, **pico 27** e (B) $17\alpha(\text{H}),21\beta(\text{H})\text{-C}_{30}\text{-norhopano}$, **pico 28**.

3.2.1.1.4 Esteranos Regulares

Os esteranos normais são formados pela redução de esteróis presentes na constituição de plantas superiores, animais e algas e ocorrem frequentemente com C₂₇ (colestanos), C₂₈ (ergostanos) e C₂₉ (estigmastanos) [Figura 48] (Peters & Moldowan, 1993). Estes biomarcadores são utilizados principalmente em estudos de correlação de óleos, como indicadores de fonte e evolução térmica (Peters & Moldowan, 1993; Brocks, *et al.*, 2003a; Peters *et al.*, 2005) e, também são afetados pelo processo de biodegradação.

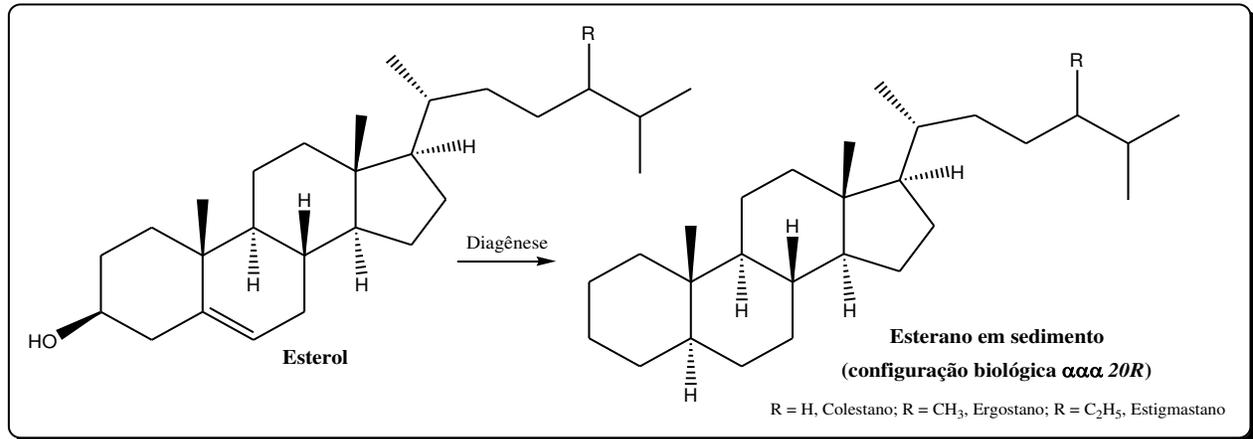


Figura 48. Formação de esteranos a partir da redução de esteróis durante o processo de diagênese.

A remoção de esteranos regulares ocorre após a completa degradação dos isoprenóides C₁₅-C₂₀ e antes ou após os hopanos (Peters *et al.*, 2005). A cinética da biodegradação destes compostos normalmente segue a ordem: $\alpha\alpha\alpha\ 20R \gg \alpha\beta\beta\ 20R + 20S \geq \alpha\alpha\alpha\ 20S \gg$ diasteranos e geralmente diminui com o aumento do número de carbonos (C₂₇ > C₂₈ > C₂₉ > C₃₀) (Seifert & Moldowan, 1979; Chosson *et al.*, 1991). Isto já foi observado tanto em reservatórios (Zhang *et al.*, 1988) quanto em laboratório (Goodwin *et al.*, 1983; Chosson *et al.*, 1991). É importante considerar que C₂₇-C₃₀ $\alpha\alpha\alpha\ 20R$ é a configuração biológica dos esteranos e por isso eles são mais rapidamente consumidos ou biodegradados do que os outros isômeros (Rullkötter & Wendisch,

1982). Outra observação importante é que a suscetibilidade relativa de $\alpha\beta\beta$ 20R, $\alpha\beta\beta$ 20S e $\alpha\alpha\alpha$ 20S varia consideravelmente e depende do tipo de microrganismo envolvido e das condições do reservatório e/ou da simulação em laboratório (Peters *et al.*, 2005).

Para avaliar a extensão da biodegradação de esteranos regulares normais e diasteranos, monitorou-se o íon fragmento m/z 217 através da técnica SIM. As **Figuras 49 e 50** apresentam os cromatogramas para o Co1 e Co2, respectivamente, com o petróleo disperso no meio. Como não houve muita variação nas taxas de biodegradação durante o monitoramento de 10 a 60 dias de ensaio, resolveu-se representar apenas os cromatogramas para 30 e 60 dias representativos para esta classe de compostos.

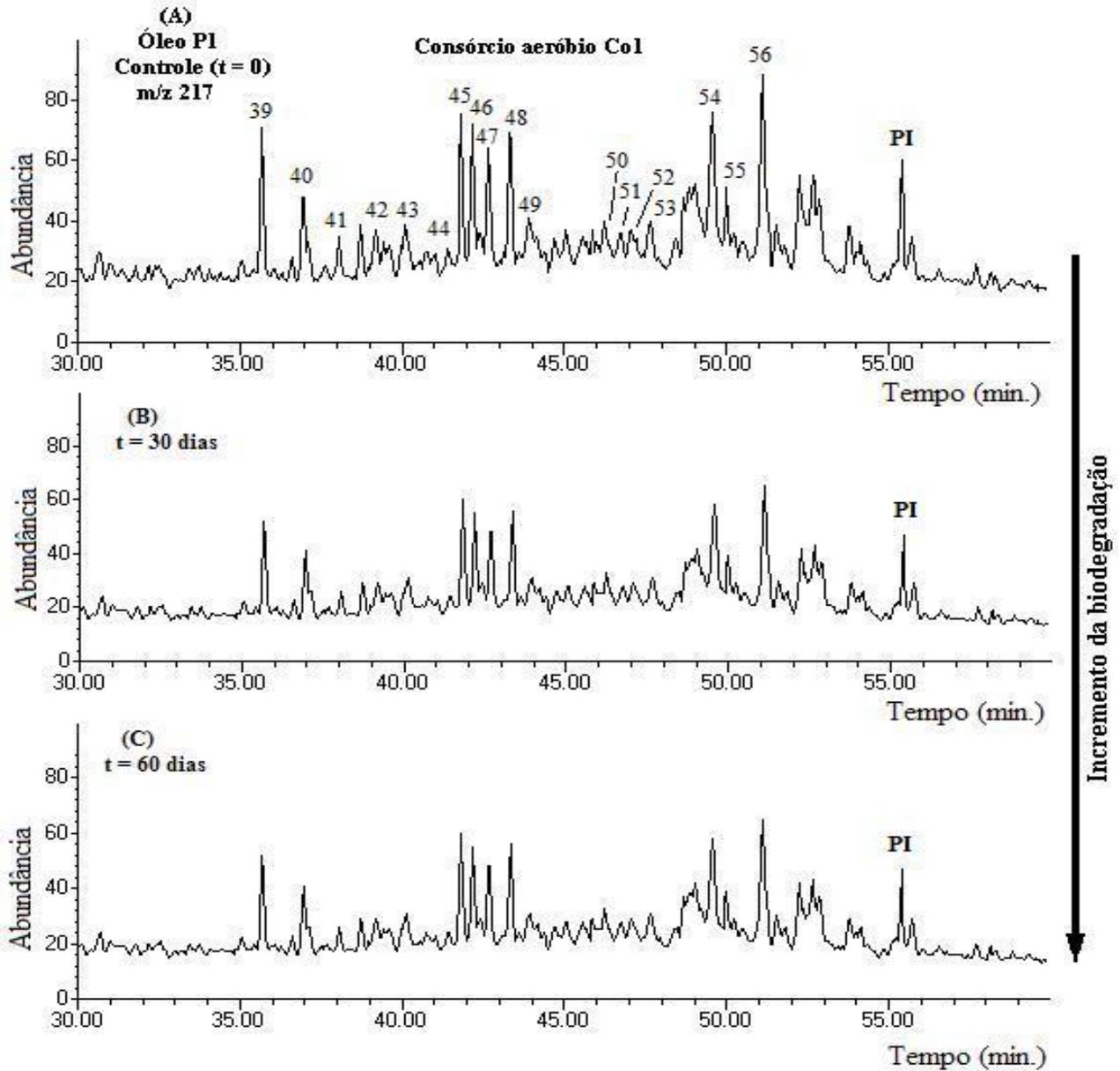


Figura 49. SIM m/z 217 mostrando o incremento da biodegradação de esteranos normais e diasteranos em (B) 30 e (C) 60 dias de monitoramento com Co1 utilizando P1 disperso no meio. PI = Padrão Interno (5α -coleston-3-ona).

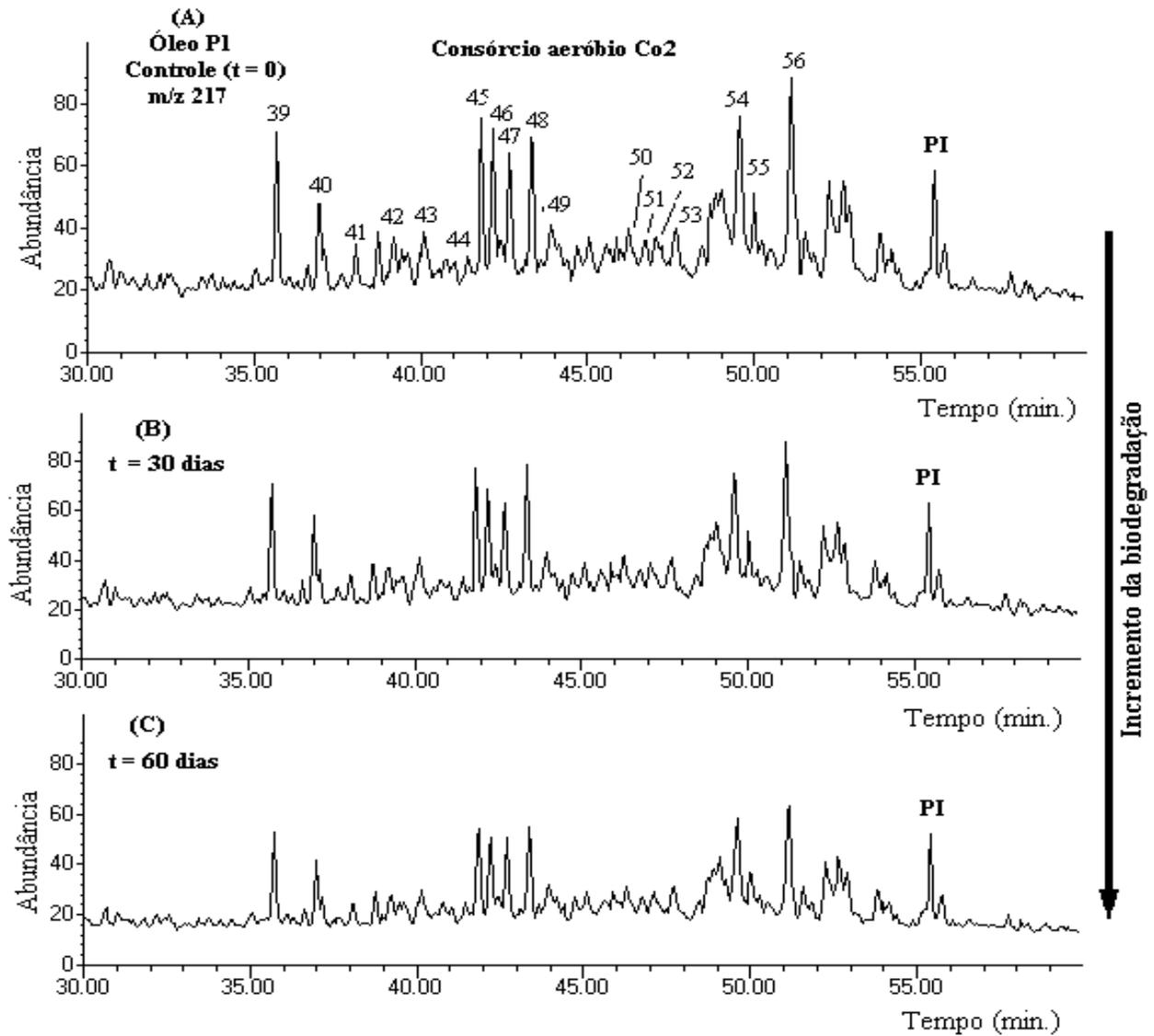


Figura 50. SIM m/z 217 mostrando o incremento da biodegradação de esteranos normais e diasteranos em (B) 30 e (C) 60 dias de monitoramento com Co_2 utilizando PI disperso no meio. PI = Padrão Interno (5α -coleston-3-ona).

A **Tabela 18** apresenta a identificação dos esteranos e diasteranos detectados através do monitoramento do íon-fragmento m/z 217.

Tabela 18. Esteranos regulares e diasteranos analisados através do íon-fragmento m/z 217

Picos	Composto	Fórmula	MM ^a	IR _c ^b	IR _L ^c
39	13β(H),17α(H)-diacolestano (20S)	C ₂₇ H ₄₈	372	2634	2640/2641
40	13β(H),17α(H)-diacolestano (20R)	C ₂₇ H ₄₈	372	2668	2674/2675
41	13α(H),17β(H)-diacolestano (20R)	C ₂₇ H ₄₈	372	2693	2699/-
42	13α(H),17β(H)-diacolestano (20S)	C ₂₇ H ₄₈	372	2735	2717/-
43	13β(H),17α(H)-24-metildiacolestano (20R)	C ₂₈ H ₅₀	386	2750	-
44	13β(H),17α(H)-24-metildiacolestano (20S)	C ₂₈ H ₅₀	386	2762	-
45	5α(H),14α(H),17α(H)-colestano (20S)	C ₂₇ H ₄₈	372	2779	2784/2796
46	5α(H),14β(H),17β(H)-colestano (20R)	C ₂₇ H ₄₈	372	2794	2800/2808
47	5α(H),14β(H),17β(H)-colestano (20S)	C ₂₇ H ₄₈	372	2802	2810/2817
48	5α(H),14α(H),17α(H)-colestano (20R)	C ₂₇ H ₄₈	372	2822	2831/2839
49	13β(H),17α(H)-24-etildiacolestano (20R)	C ₂₉ H ₅₂	400	2835	2844/2850
50	5α(H),14α(H),17α(H)-24-metilcolestano (20S)	C ₂₈ H ₅₀	386	2879	2888/2894
51	5α(H),14β(H),17β(H)-24-metilcolestano (20R)	C ₂₈ H ₅₀	386	2896	2900/-
52	5α(H),14β(H),17β(H)-24-metilcolestano (20S)	C ₂₈ H ₅₀	386	2918	2910/-
53	5α(H),14α(H),17α(H)-24-metilcolestano (20R)	C ₂₈ H ₅₀	386	2941	2936/2948
54	5α(H),14α(H),17α(H)-24-etilcolestano (20S)	C ₂₉ H ₅₂	400	2963	2959/2978
55	5α(H),14β(H),17β(H)-24-etilcolestano (20S)	C ₂₉ H ₅₂	400	2992	2992/3005
56	5α(H),14α(H),17α(H)-24-etilcolestano (20R)	C ₂₉ H ₅₂	400	3016	3026/3041

^aMM = Massa Molecular; ^bIRC = Índice de retenção calculado; ^cIR_L = Índice de retenção da literatura (Lima, 2005; Rodrigues, 2000). De acordo com Lima (2000) IR para 13β(H),17α(H)-24-metildiacolestano (20R+20S) = 2769.

A concentração em µg/g F1 e as taxas de biodegradação calculadas para 30 e 60 dias de experimento com os consórcios Co1 e Co2 utilizando P1 disperso no meio, estão descritas na **Tabela 19**.

Tabela 19. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para esteranos em m/z 217 com Co1 e Co2

Pico	Concentração / TB (%)*				
	Tempo (dias)				
	Co1			Co2	
	0	30	60	30	60
39	36,4 \pm 1,0	28,2 / 23 \pm 3,8	23,4 / 36 \pm 3,2	28,9 / 21 \pm 2,5	25,2 / 31 \pm 2,6
40	13,8 \pm 2,7	9,2 / 33 \pm 1,0	8,6 / 38 \pm 2,0	8,8 / 36 \pm 1,9	8,5 / 38 \pm 3,2
41	5,8 \pm 3,0	3,8 / 34 \pm 1,9	3,5 / 40 \pm 3,0	4,0 / 31 \pm 3,8	3,6 / 40 \pm 1,0
42	4,9 \pm 3,2	3,1 / 37 \pm 2,7	3,0 / 39 \pm 2,0	3,5 / 29 \pm 3,6	3,0 / 39 \pm 1,1
43	4,6 \pm 0,8	3,8 / 17 \pm 2,7	3,2 / 30 \pm 2,4	3,6 / 22 \pm 1,2	3,4 / 26 \pm 1,8
44	2,5 \pm 2,5	2,2 / 12 \pm 0,8	1,8 / 28 \pm 2,7	2,3 / 8 \pm 2,6	1,9 / 24 \pm 1,7
45	34,2 \pm 2,6	18,4 / 46 \pm 2,1	12,7 / 63 \pm 1,4	18,6 / 46 \pm 1,5	13,5 / 61 \pm 1,6
46	35,1 \pm 2,1	17,6 / 50 \pm 2,6	12,7 / 64 \pm 1,2	18,2 / 48 \pm 3,2	13,3 / 62 \pm 3,1
47	22,1 \pm 2,4	14,6 / 34 \pm 2,6	8,2 / 63 \pm 1,4	14,8 / 33 \pm 1,0	8,7 / 61 \pm 1,7
48	24,6 \pm 2,4	14,4 / 41 \pm 2,3	8,2 / 67 \pm 2,0	13,9 / 43 \pm 2,2	8,0 / 67 \pm 1,4
49	4,5 \pm 1,6	4,0 / 11 \pm 1,4	3,4 / 24 \pm 3,8	3,8 / 16 \pm 1,0	3,5 / 22 \pm 2,5
50	3,3 \pm 2,7	2,4 / 27 \pm 1,2	1,6 / 52 \pm 0,9	2,3 / 30 \pm 1,8	1,8 / 45 \pm 1,4
51	2,1 \pm 1,5	1,5 / 29 \pm 2,2	1,0 / 52 \pm 3,1	1,7 / 19 \pm 1,5	1,1 / 48 \pm 1,9
52	2,4 \pm 2,0	1,6 / 33 \pm 1,7	1,1 / 54 \pm 1,4	1,7 / 29 \pm 1,7	1,3 / 46 \pm 2,2
53	3,6 \pm 1,7	2,3 / 36 \pm 1,4	1,7 / 53 \pm 2,2	2,6 / 28 \pm 3,1	1,8 / 50 \pm 2,5
54	33,8 \pm 1,9	21,3 / 37 \pm 3,8	18,9 / 44 \pm 1,9	21,6 / 36 \pm 2,2	19,8 / 41 \pm 3,1
55	4,0 \pm 2,2	2,6 / 35 \pm 1,9	2,2 / 45 \pm 1,4	2,4 / 40 \pm 2,2	2,3 / 43 \pm 1,4
56	36,1 \pm 1,0	28,6 / 21 \pm 3,2	19,2 / 47 \pm 1,2	28,4 / 21 \pm 3,0	20,1 / 44 \pm 1,9

*Média de duplicata, desvio padrão (n=2).

Em nosso experimento, observou-se a remoção preferencial de C_{27} $\alpha\alpha\alpha$ 20R (pico 48) > C_{27} $\alpha\beta\beta$ 20R (pico 46) ~ C_{27} $\alpha\beta\beta$ 20S (pico 47) \geq C_{27} $\alpha\alpha\alpha$ 20S (pico 45) > C_{28} $\alpha\alpha\alpha$ 20R (pico 53) > C_{28} $\alpha\beta\beta$ 20R (pico 51) ~ C_{28} $\alpha\beta\beta$ 20S (pico 52) > C_{28} $\alpha\alpha\alpha$ 20S (pico 50) > C_{29} $\alpha\alpha\alpha$ 20R (pico 56) > C_{29} $\alpha\beta\beta$ 20S (pico 55) > C_{29} $\alpha\alpha\alpha$ 20S (pico

54) >> diasteranos (**picos 39-44**) para os dois consórcios aeróbios [*Figuras 49 e 50, págs. 109 e 110 e Tabelas 18 e 19, págs. 111 e 112*]. Notou-se, ainda, que os esteranos foram menos suscetíveis ao processo de biodegradação do que os hopanos nestas condições de aerobiose. Nossos resultados foram semelhantes aos descritos por Volkman *et al.* (1983b), que mostraram a remoção preferencial de $\alpha\alpha\alpha$ 20R > $\alpha\beta\beta$ 20R + 20S > $\alpha\alpha\alpha$ 20S em óleos biodegradados no reservatório os quais também apresentaram enriquecimentos de 25-norhopanos. Por outro lado, Seifert *et al.* (1984) ao estudar óleos da Grécia que possuíam hopanos intactos e ausência de 25-norhopanos observaram um comportamento oposto onde ocorreu completa degradação de $\alpha\alpha\alpha$ 20R esteranos C₂₇-C₂₉, parcial remoção de $\alpha\alpha\alpha$ 20S esteranos C₂₇ > C₂₈ > C₂₉ e nenhuma degradação de $\alpha\beta\beta$ 20R + 20S esteranos. Para simulações de laboratório pode-se citar como exemplo o trabalho de Chosson *et al.*, (1992) que também mostrou a remoção preferencial de esteranos $\alpha\alpha\alpha$ 20R > $\alpha\beta\beta$ 20R ≥ $\alpha\beta\beta$ 20S > $\alpha\alpha\alpha$ 20S usando cultura de bactérias aeróbias que degradam hopanos sem formação de 25-norhopanos, semelhante ao nosso estudo em condições aeróbias.

Nas condições aeróbias que utilizamos e com P1 disperso no meio, observou-se a remoção preferencial de hopanos (**picos 30-38**, *Figuras 38 e 39, págs. 89 e 90, Tabelas 14, 15 e 16, págs. 91, 97 e 99*) (com enriquecimento de 25-norhopanos, **picos 26-29**, *Figuras 38 e 39, Tabelas 14 e 17, págs. 91 e 105*) antes dos esteranos (**picos 45-56**, *Figuras 49 e 50, págs. 109 e 110 e Tabelas 18 e 19, págs. 111 e 112*) e isto levou a um aumento da razão esterano/hopano para ambos os consórcios aeróbios [**Tabela 44**, *pág. 219*].

3.2.1.2 Análise da fração neutra saturada com petróleo adsorvido em areia

O contato direto do petróleo com água e com rochas sedimentares durante o processo de migração pode provocar perda dos seus componentes mais polares e também acelerar sua biodegradação (efeito de geocromatografia). Para verificar a influência de superfície física (como as rochas nos reservatórios) e os minerais nela presentes, utilizou-se o petróleo adsorvido em uma matriz de areia. Neste item descreve-se os resultados obtidos para esta simulação.

A identificação dos consórcios com petróleo adsorvido em areia revelou a presença de gêneros bacterianos também encontrados nos consórcios aeróbios utilizando P1 disperso no meio, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium* e *Mezorhizobium*, além de 1 clone do gênero *Stenotrophomonas* e 4 clones de microrganismos tidos como não cultivados. Torna-se importante ressaltar a predominância de bactérias dos gêneros *Achromobacter* e *Bacillus* em ambos os cultivos.

3.2.1.2.1 *n*-alcanos e isoprenóides

Os cromatogramas de íons extraídos em m/z 71 com P1 adsorvido em areia para Co1 e Co2 são apresentados nas **Figuras 51 e 52**, respectivamente. As **Tabelas 20 e 21** apresentam as taxas de biodegradação para *n*-alcanos (C₁₃-C₃₂) e isoprenóides (P e F), com Co1 e Co2, respectivamente.

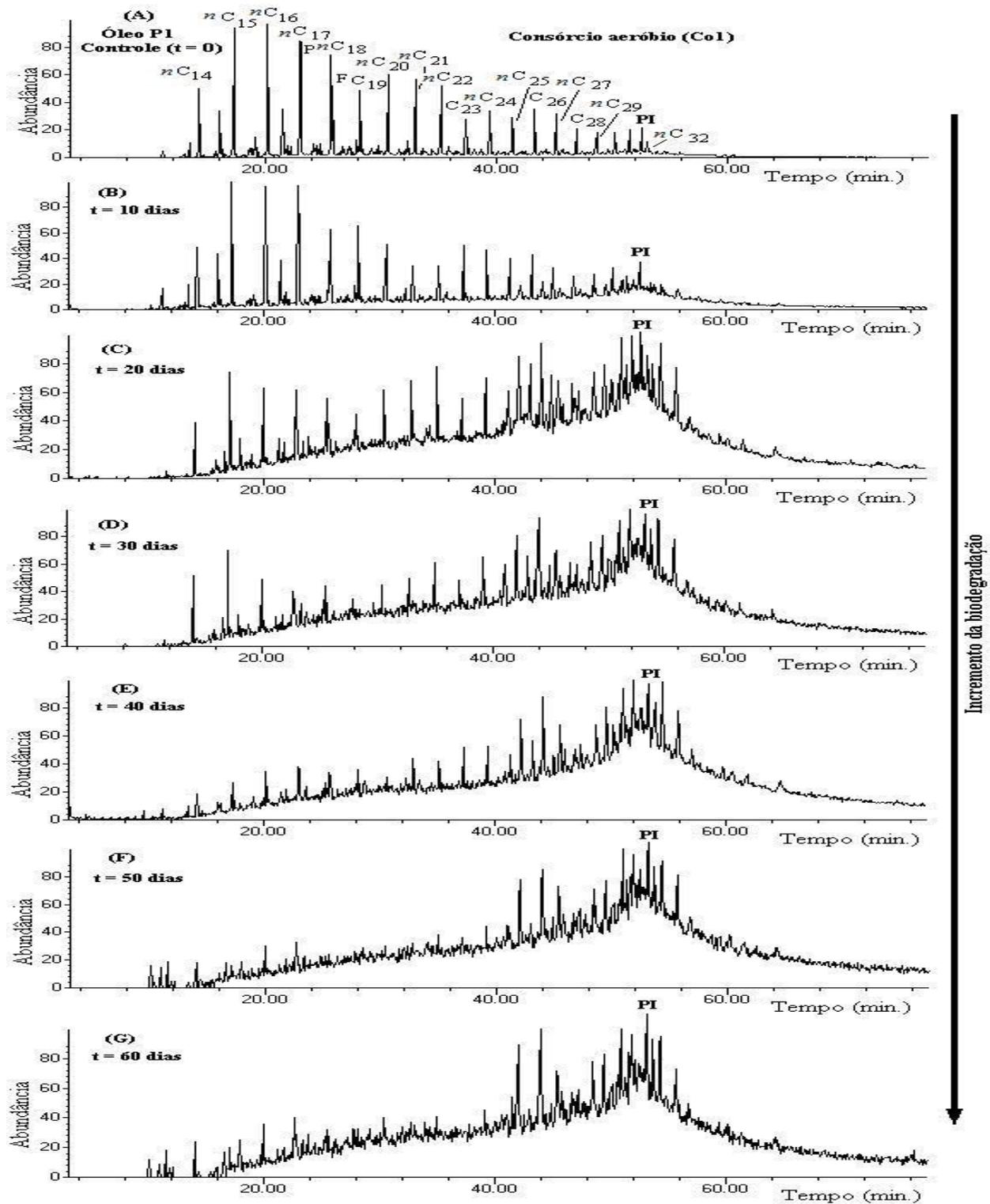


Figura 51. RIC m/z 71 para monitorar a biodegradação de P1 adsorvido em areia pelo Co1. nC_{14} - nC_{32} = n -alcanos; P = Pristano; F = Fitano; PI = Padrão Interno (5 α -colestano-3-ona).

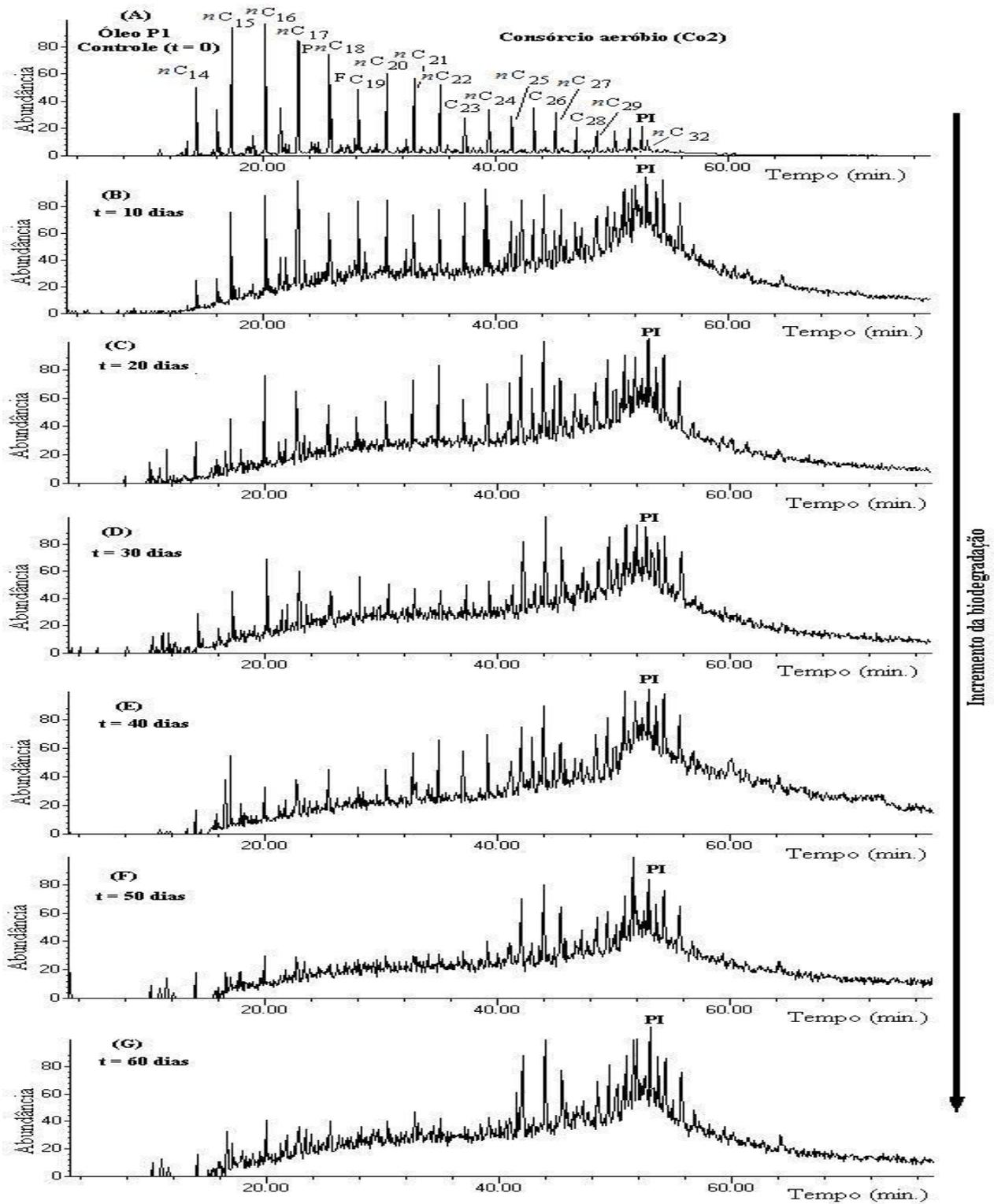


Figura 52. RIC m/z 71 para monitorar a biodegradação de P1 adsorvido em areia pelo Co2. nC_{14} - nC_{32} = n -alcanos; P = Pristano; F = Fitano; PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

Tabela 20. Taxas de biodegradação (TB, %) para *n*-alcanos e isoprenóides utilizando P1 adsorvido em areia com Co1

Pico	Composto	Fórmula	MM ^a	Taxas de Biodegradação (%) ^b /Tempo (dias)					
				10	20	30	40	50	60
<i>n</i> C ₁₃	<i>n</i> -Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	184	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₄	<i>n</i> -Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀	198	82 ± 1,3	84 ± 1,1	88 ± 1,9	94 ± 1,3	94 ± 1,8	96 ± 0,9
<i>n</i> C ₁₅	<i>n</i> -Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	212	89 ± 1,8	91 ± 0,8	91 ± 2,6	97 ± 2,3	> 99 ± 1,0	> 99 ± 1,60
<i>n</i> C ₁₆	<i>n</i> -Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	226	87 ± 1,6	90 ± 2,1	93 ± 1,4	96 ± 1,1	97 ± 2,9	98 ± 2,4
<i>n</i> C ₁₇	<i>n</i> -Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	240	86 ± 1,4	90 ± 1,3	92 ± 1,2	94 ± 3,2	99 ± 3,1	> 99 ± 1,1
P	Pristano	C ₁₉ H ₄₀	268	88 ± 1,7	89 ± 2,5	91 ± 2,3	94 ± 1,8	98 ± 1,5	> 99 ± 0,6
<i>n</i> C ₁₈	<i>n</i> -Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	254	82 ± 1,5	90 ± 2,0	92 ± 1,5	94 ± 2,1	> 99 ± 1,3	> 99 ± 0,8
F	Fitano	C ₂₀ H ₄₂	282	82 ± 1,3	82 ± 3,1	91 ± 2,4	92 ± 2,2	96 ± 1,8	98 ± 2,7
<i>n</i> C ₁₉	<i>n</i> -Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	268	70 ± 1,2	86 ± 2,9	91 ± 3,0	99 ± 2,3	> 99 ± 1,1	> 99 ± 1,7
<i>n</i> C ₂₀	<i>n</i> -Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	282	74 ± 1,1	90 ± 1,6	90 ± 2,6	97 ± 1,3	> 99 ± 1,3	> 99 ± 2,0
<i>n</i> C ₂₁	<i>n</i> -Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	296	79 ± 2,1	88 ± 0,8	89 ± 1,1	93 ± 1,9	> 99 ± 1,1	> 99 ± 1,2
<i>n</i> C ₂₂	<i>n</i> -Docosano	C ₂₂ H ₄₆	310	72 ± 1,9	87 ± 1,0	89 ± 2,3	93 ± 2,3	> 99 ± 1,6	> 99 ± 1,6
<i>n</i> C ₂₃	<i>n</i> -Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	324	72 ± 2,0	84 ± 1,2	85 ± 2,5	91 ± 2,9	> 99 ± 2,1	> 99 ± 2,7
<i>n</i> C ₂₄	<i>n</i> -Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	338	66 ± 1,0	71 ± 2,1	86 ± 1,8	87 ± 1,6	> 99 ± 2,2	> 99 ± 1,3
<i>n</i> C ₂₅	<i>n</i> -Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	352	59 ± 1,3	65 ± 1,9	78 ± 1,6	79 ± 1,5	> 99 ± 1,9	> 99 ± 0,9
<i>n</i> C ₂₆	<i>n</i> -Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	366	7 ± 2,3	68 ± 1,3	80 ± 0,9	81 ± 1,3	> 99 ± 1,8	> 99 ± 0,8
<i>n</i> C ₂₇	<i>n</i> -Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	380	81 ± 3,2	> 99 ± 1,5	> 99 ± 1,2	> 99 ± 0,6	> 99 ± 0,7	> 99 ± 2,8
<i>n</i> C ₂₈	<i>n</i> -Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	394	74 ± 2,4	> 99 ± 2,0	> 99 ± 0,9	> 99 ± 1,2	> 99 ± 1,6	> 99 ± 2,6
<i>n</i> C ₂₉	<i>n</i> -Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	408	< 1 ± 2,3	> 99 ± 1,9	> 99 ± 1,2	> 99 ± 1,4	> 99 ± 2,9	> 99 ± 0,6
<i>n</i> C ₃₀	<i>n</i> -Triacontano	C ₃₀ H ₆₂	422	44 ± 2,2	> 99 ± 2,8	> 99 ± 1,0	> 99 ± 1,1	> 99 ± 1,8	> 99 ± 1,5
<i>n</i> C ₃₁	<i>n</i> -Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	436	58 ± 1,4	> 99 ± 2,9	> 99 ± 1,3	> 99 ± 2,4	> 99 ± 0,9	> 99 ± 1,2
<i>n</i> C ₃₂	<i>n</i> -Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆	450	35 ± 1,6	> 99 ± 2,7	> 99 ± 1,4	> 99 ± 1,3	> 99 ± 1,6	> 99 ± 1,1

^aMM = Massa Molecular; ^bMédia de duplicata, desvio padrão (n=2).

Tabela 21. Taxas de biodegradação (TB, %) para *n*-alcanos e isoprenóides utilizando P1 adsorvido em areia com Co2

Pico	Composto	Fórmula	MM ^a	Taxas de Biodegradação (%) ^b /Tempo (dias)					
				10	20	30	40	50	60
<i>n</i> C ₁₃	<i>n</i> -Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	184	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₄	<i>n</i> -Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀	198	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₅	<i>n</i> -Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	212	85 ± 1,9	89 ± 1,3	97 ± 1,3	99 ± 1,1	> 99 ± 1,8	> 99 ± 0,9
<i>n</i> C ₁₆	<i>n</i> -Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	226	85 ± 2,1	88 ± 1,6	97 ± 1,1	98 ± 1,4	> 99 ± 2,9	> 99 ± 2,4
<i>n</i> C ₁₇	<i>n</i> -Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	240	83 ± 1,3	94 ± 1,4	99 ± 3,2	99 ± 1,2	> 99 ± 1,1	> 99 ± 3,1
P	Pristano	C ₁₉ H ₄₀	268	83 ± 2,5	93 ± 1,7	98 ± 1,8	98 ± 2,3	> 99 ± 0,6	> 99 ± 1,5
<i>n</i> C ₁₈	<i>n</i> -Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	254	80 ± 2,0	86 ± 1,5	98 ± 2,1	98 ± 1,5	> 99 ± 0,8	> 99 ± 1,3
F	Fitano	C ₂₀ H ₄₂	282	72 ± 3,1	85 ± 1,3	97 ± 2,2	97 ± 2,4	> 99 ± 2,7	> 99 ± 1,8
<i>n</i> C ₁₉	<i>n</i> -Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	268	71 ± 2,9	78 ± 1,2	94 ± 2,3	97 ± 3,0	> 99 ± 1,7	> 99 ± 1,1
<i>n</i> C ₂₀	<i>n</i> -Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	282	72 ± 1,6	73 ± 1,1	94 ± 1,3	96 ± 2,6	> 99 ± 2,0	> 99 ± 1,3
<i>n</i> C ₂₁	<i>n</i> -Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	296	72 ± 0,8	78 ± 2,1	92 ± 1,9	96 ± 1,1	> 99 ± 1,2	> 99 ± 1,1
<i>n</i> C ₂₂	<i>n</i> -Docosano	C ₂₂ H ₄₆	310	72 ± 1,0	73 ± 1,9	93 ± 2,5	93 ± 2,9	> 99 ± 2,1	> 99 ± 2,7
<i>n</i> C ₂₃	<i>n</i> -Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	324	58 ± 1,2	72 ± 2,0	93 ± 2,3	97 ± 2,3	> 99 ± 1,6	> 99 ± 1,6
<i>n</i> C ₂₄	<i>n</i> -Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	338	61 ± 2,1	68 ± 1,0	90 ± 1,6	95 ± 1,8	> 99 ± 1,3	> 99 ± 2,2
<i>n</i> C ₂₅	<i>n</i> -Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	352	41 ± 1,9	54 ± 1,3	90 ± 1,5	> 99 ± 1,6	> 99 ± 0,9	> 99 ± 1,9
<i>n</i> C ₂₆	<i>n</i> -Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	366	54 ± 1,3	71 ± 2,3	89 ± 1,3	> 99 ± 0,9	> 99 ± 0,8	> 99 ± 1,8
<i>n</i> C ₂₇	<i>n</i> -Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	380	69 ± 1,5	> 99 ± 3,2	> 99 ± 0,6	> 99 ± 1,2	> 99 ± 2,8	> 99 ± 0,7
<i>n</i> C ₂₈	<i>n</i> -Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	394	56 ± 0,9	> 99 ± 1,2	> 99 ± 2,4	> 99 ± 2,0	> 99 ± 2,6	> 99 ± 1,6
<i>n</i> C ₂₉	<i>n</i> -Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	408	9 ± 2,	> 99 ± 2,2	> 99 ± 1,1	> 99 ± 1,0	> 99 ± 1,8	> 99 ± 2,9
<i>n</i> C ₃₀	<i>n</i> -Triacontano	C ₃₀ H ₆₂	422	30 ± 1,9	> 99 8 ± 2,3	> 99 ± 1,4	> 99 ± 1,2	> 99 ± 0,6	> 99 ± 1,5
<i>n</i> C ₃₁	<i>n</i> -Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	436	23 ± 2,7	> 99 ± 1,6	> 99 ± 1,4	> 99 ± 1,6	> 99 ± 1,3	> 99 ± 1,2
<i>n</i> C ₃₂	<i>n</i> -Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆	450	35 ± 2,9	> 99 ± 1,4	> 99 ± 1,3	> 99 ± 0,9	> 99 ± 2,4	> 99 ± 1,1

^aMM = Massa Molecular; ^bMédia de duplicata, desvio padrão (n=2).

Quando se utilizou P1 adsorvido em areia houve biodegradação mais pronunciada para os dois consórcios e em menor intervalo de tempo quando comparado ao ensaio com P1 disperso no meio. Em 60 dias de ensaio observou-se que a série homóloga de *n*-alcanos e os isoprenóides P e F foram quase completamente biodegradados com os dois consórcios. Nota-se também que com 20 dias de ensaio os *n*-alcanos de maior peso molecular (C_{27} - C_{32}) foram severamente biodegradados, contrário ao que se observou para o primeiro ensaio, onde os *n*-alcanos de menor peso molecular (C_{13} - C_{17}) foram mais suscetíveis ao processo de biodegradação na fase inicial (10 a 20 dias). Isto mostra que a matriz utilizada influencia na biodegradação, acelerando o processo e possibilitando a degradação preferencial dos componentes mais pesados. Além disso, a presença de bactérias *Stenotrophomonas* e de clones não cultivados também pode estar influenciando estes aspectos não observados no ensaio com P1 disperso no meio.

Assim como ocorreu no ensaio com P1 disperso no meio, a degradação de *n*-alcanos antes dos isoprenóides, para ambos os consórcios, resultou no aumento das razões P/nC_{17} e F/nC_{18} e na diminuição da razão P/F [Tabela 43, pág. 213]. Semelhantemente, o IPC apresentou valores < 1 durante o processo de biodegradação, sugerindo novamente, que os consórcios aeróbios degradam alcanos com número par de carbonos em preferência aos alcanos com número ímpar de carbono [Tabela 43].

3.2.1.2.2 Sesquiterpanos Bicíclicos

Os sesquiterpanos bicíclicos com esqueletos tipo drimano e homodrimano detectados neste estudo através do RIC m/z 123 foram biodegradados por ambos os consórcios quando se utilizou P1 adsorvido em areia, diferentemente do que ocorreu no ensaio com P1 disperso no meio onde apenas o Co_2 biodegradou esta classe de biomarcadores. Isto mostra mais uma vez, que de alguma forma, a matriz e/ou os

microrganismos envolvidos influencia a biodegradação das classes de biomarcadores do petróleo. A **Figura 53** apresenta o RIC m/z 123 para a amostra controle e ambos os consórcios após 60 dias de ensaio.

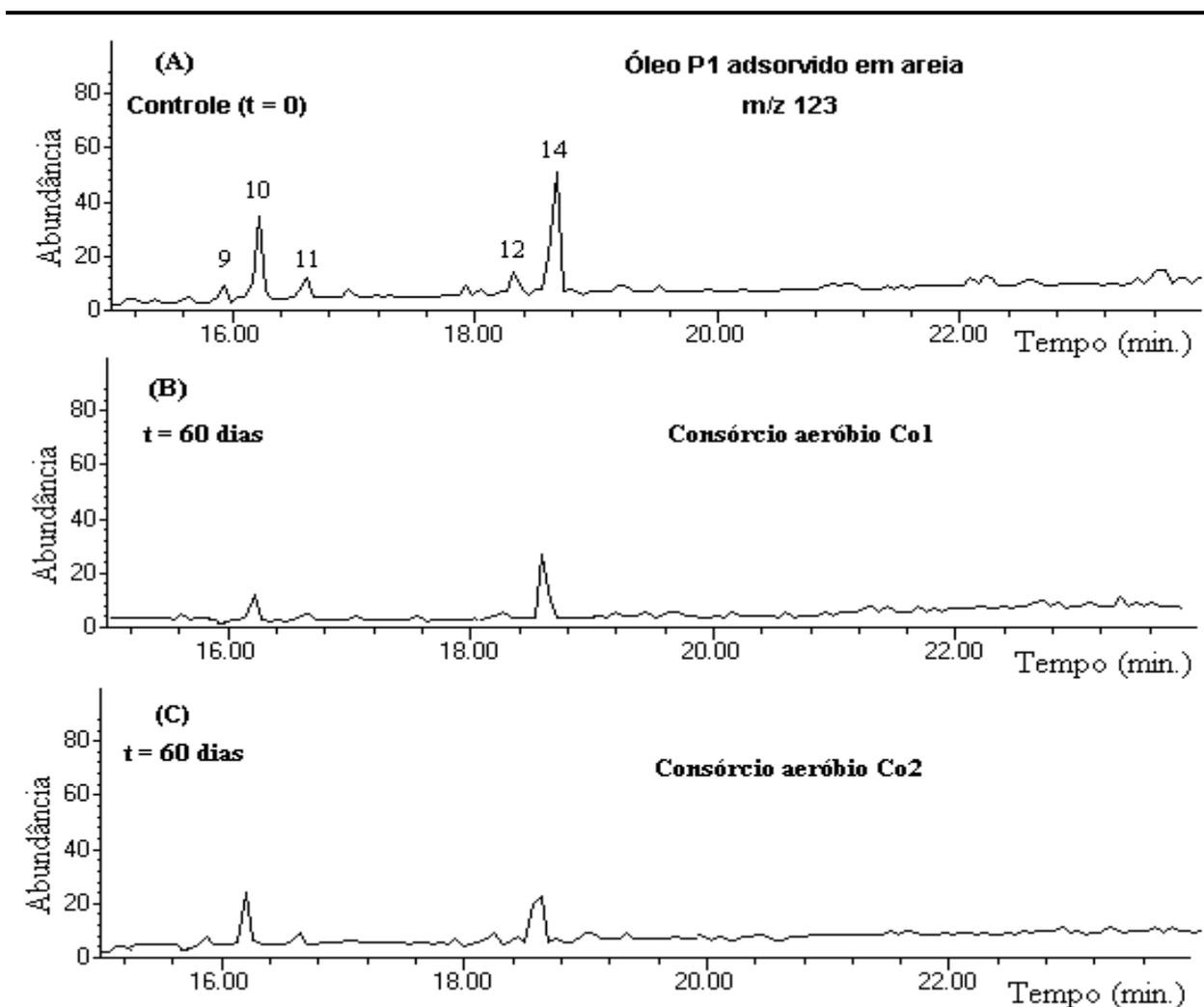


Figura 53. RIC m/z 123 com monitoramento da biodegradação dos sesquiterpanos bicíclicos de P1 adsorvido em areia para (B) Co1 e (C) Co2 em 60 dias de monitoramento.

3.2.1.2.3 Terpanos Tricíclicos, Tetracíclicos e Pentacíclicos

Os terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos foram analisados através do SIM m/z 191. As **Figuras 54** e **55** apresentam os cromatogramas obtidos para Co1 e Co2 com P1 adsorvido em areia, respectivamente e a **Tabela 22** mostra a concentração em $\mu\text{g/g}$ F1 e as taxas de biodegradação calculadas.

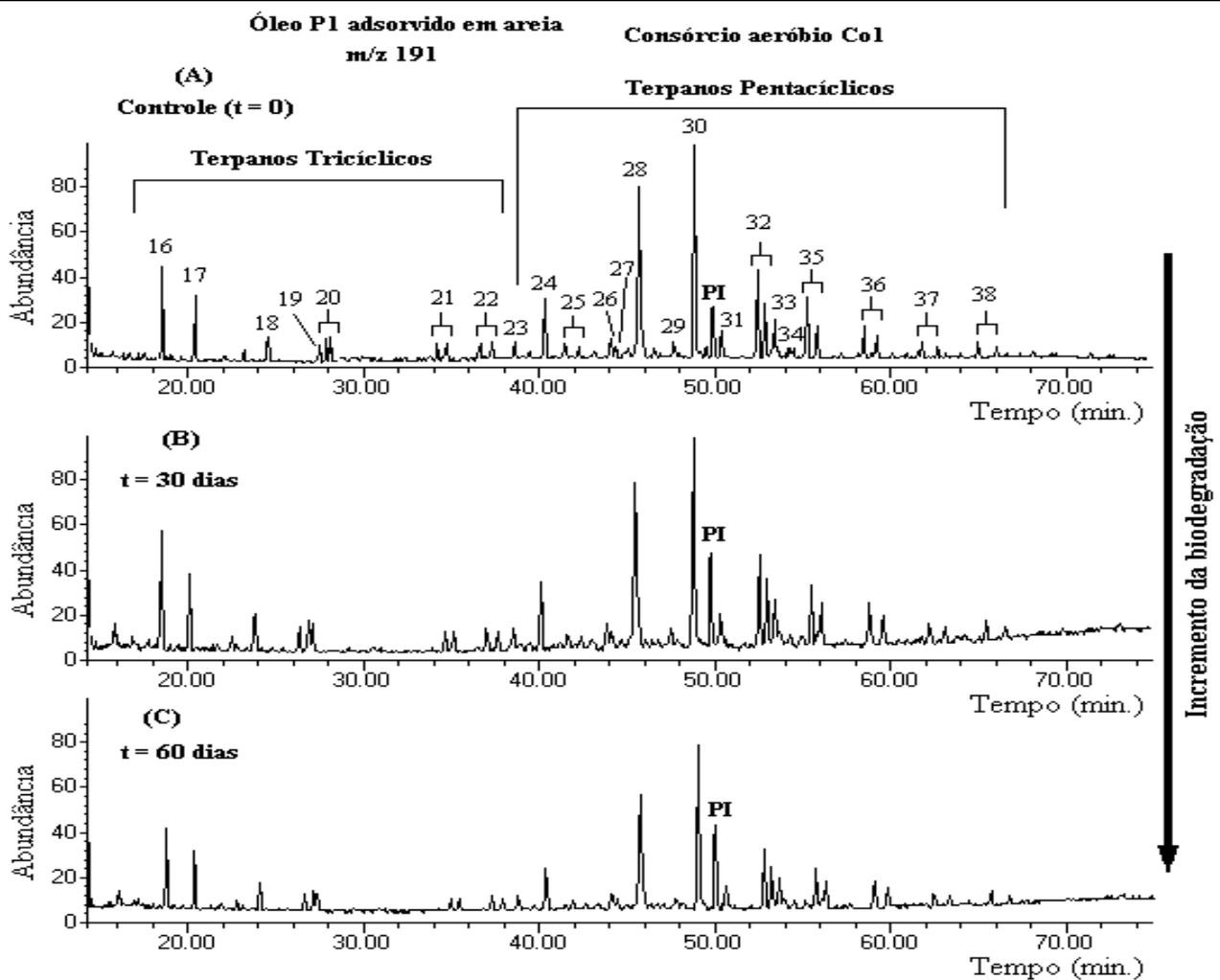


Figura 54. SIM m/z 191 para P1 adsorvido em areia mostrando a biodegradação de terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos em (B) 30 e (C) 60 dias de monitoramento pelo Co1. PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

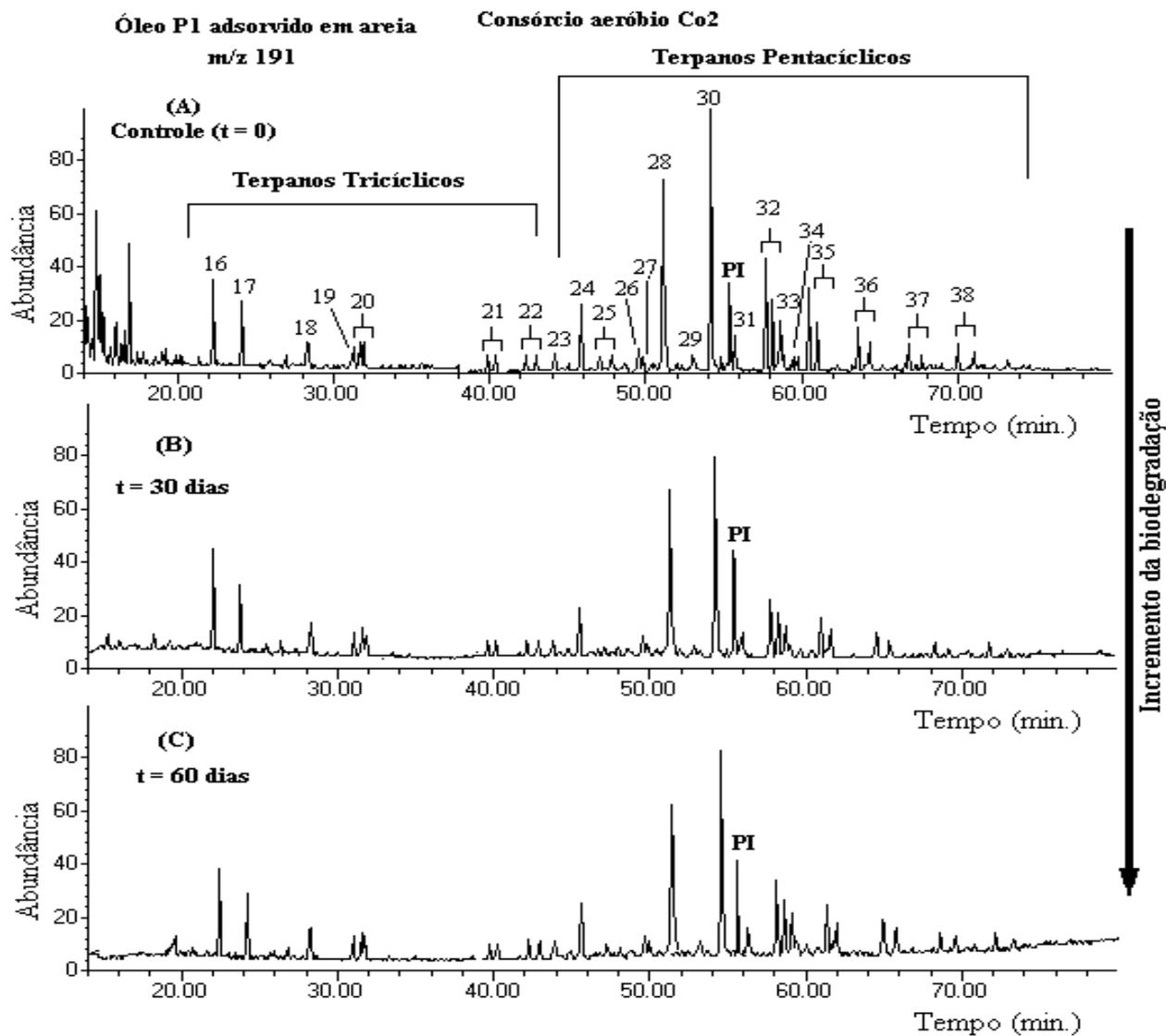


Figura 55. SIM m/z 191 para P1 adsorvido em areia mostrando a biodegradação de terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos em (B) 30 e (C) 60 dias de monitoramento pelo Co2. PI = Padrão Interno (5α -colestan-3-ona).

Tabela 22. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos monitorando m/z 191 com P1 adsorvido em areia para Co1 e Co2 em 30 e 60 dias

Pico	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%)*				
	Tempo (dias)				
	0	Co1		Co2	
30		60	30	60	
16	33,0 \pm 3,0	29,0 / 12 \pm 2,4	27,8 / 16 \pm 2,5	29,2 / 12 \pm 1,2	28,8 / 13 \pm 2,7
17	16,5 \pm 1,0	15,7 / 5 \pm 1,1	13,3 / 19 \pm 3,2	15,9 / 4 \pm 1,8	13,4 / 18 \pm 3,4
18	5,9 \pm 2,7	5,8 / 2 \pm 1,4	5,0 / 15 \pm 2,0	5,8 / 2 \pm 1,5	5,2 / 12 \pm 1,9
19	4,8 \pm 3,8	4,7 / 2 \pm 1,5	4,2 / 13 \pm 1,9	4,7 / 2 \pm 1,4	4,5 / 6 \pm 3,6
20S	6,0 \pm 3,2	5,8 / 3 \pm 2,0	5,0 / 17 \pm 2,7	5,8 / 3 \pm 3,8	5,1 / 15 \pm 1,7
20R	6,1 \pm 0,8	5,8 / 5 \pm 1,9	4,9 / 20 \pm 2,4	5,9 / 38 \pm 2,0	5,1 / 16 \pm 2,6
21S	5,3 \pm 2,1	4,8 / 9 \pm 1,9	4,4 / 17 \pm 1,2	5,0 / 7 \pm 2,3	4,5 / 15 \pm 1,5
21R	5,9 \pm 2,6	5,0 / 15 \pm 1,9	4,8 / 19 \pm 1,4	5,2 / 12 \pm 3,1	4,8 / 19 \pm 2,5
22S	4,9 \pm 2,4	4,4 / 10 \pm 1,9	4,3 / 12 \pm 1,4	4,7 / 4 \pm 1,2	4,2 / 14 \pm 1,0
22R	5,2 \pm 2,4	4,7 / 10 \pm 1,9	4,5 / 13 \pm 1,7	4,8 / 8 \pm 1,7	4,4 / 15 \pm 2,2
23	5,4 \pm 1,6	5,2 / 4 \pm 1,4	4,3 / 20 \pm 1,9	5,3 / 2 \pm 1,6	4,4 / 19 \pm 1,0
24	15,6 \pm 2,7	14,2 / 9 \pm 1,7	11,6 / 27 \pm 2,5	14,0 / 10 \pm 1,8	11,8 / 24 \pm 1,3
25S	4,5 \pm 2,0	4,4 / 2 \pm 1,9	4,0 / 11 \pm 2,2	4,4 / 2 \pm 1,5	4,2 / 7 \pm 2,1
25R	4,8 \pm 1,5	4,6 / 4 \pm 2,5	4,2 / 13 \pm 1,9	4,7 / 2 \pm 1,2	4,4 / 8 \pm 2,0
26	4,6 \pm 1,7	4,7 / 2 \pm 1,7	4,8 / 4 \pm 3,1	4,6 / 0 \pm 3,0	4,8 / 4 \pm 3,2
27	3,8 \pm 1,9	3,8 / 0 \pm 1,9	3,9 / 3 \pm 1,9	3,9 / 3 \pm 2,1	4,1 / 8 \pm 1,7
28	70,2 \pm 2,2	58,5 / 17 \pm 1,7	44,6 / 36 \pm 1,6	59,4 / 15 \pm 1,2	46,7 / 33 \pm 1,4
29	4,0 \pm 1,4	4,0 / 0 \pm 1,1	4,2 / 5 \pm 1,2	4,0 / 0 \pm 1,8	4,1 / 3 \pm 1,6
30	120,0 \pm 1,9	108,6 / 10 \pm 0,9	36,3 / 70 \pm 3,8	111,3 / 7 \pm 0,9	42,4 / 65 \pm 2,5
31	10,2 \pm 1,4	8,2 / 20 \pm 1,9	5,8 / 43 \pm 2,0	8,8 / 14 \pm 2,8	4,8 / 53 \pm 2,2
32S	34,2 \pm 2,5	29,2 / 15 \pm 1,5	22,6 / 34 \pm 2,2	33,0 / 4 \pm 1,8	23,8 / 30 \pm 1,4
32R	13,9 \pm 1,7	10,4 / 25 \pm 1,7	8,8 / 37 \pm 0,9	12,3 / 12 \pm 1,4	7,8 / 44 \pm 2,1
33	12,8 \pm 1,4	9,5 / 26 \pm 0,8	4,7 / 63 \pm 1,0	10,5 / 18 \pm 1,4	4,8 / 63 \pm 4,0

34	3,8 ± 2,2	3,5 / 8 ± 1,4	2,8 / 26 ± 1,3	3,4 / 11 ± 2,1	2,9 / 24 ± 1,9
35S	15,2 ± 1,0	10,5 / 31 ± 3,0	8,9 / 41 ± 2,8	14,0 / 8 ± 2,1	8,2 / 46 ± 2,2
35R	12,7 ± 1,1	7,3 / 43 ± 0,7	6,4 / 50 ± 1,9	7,4 / 42 ± 2,0	5,8 / 54 ± 1,3
36S	12,6 ± 2,2	6,9 / 45 ± 2,1	5,5 / 56 ± 2,1	7,1 / 44 ± 1,8	5,7 / 55 ± 423
36R	6,2 ± 1,8	3,3 / 47 ± 3,1	2,6 / 58 ± 1,0	3,4 / 45 ± 31	2,7 / 56 ± 3,1
37S	4,8 ± 1,3	2,6 / 46 ± 2,4	2,0 / 58 ± 2,9	2,7 / 44 ± 3,2	2,1 / 56 ± 1,4
37R	3,2 ± 1,4	1,6 / 50 ± 1,7	1,3 / 59 ± 0,9	1,7 / 47 ± 2,5	1,3 / 59 ± 0,9
38S	4,1 ± 3,1	2,1 / 49 ± 2,2	1,5 / 63 ± 1,6	2,2 / 46 ± 1,1	1,7 / 59 ± 1,2
38R	2,8 ± 0,9	1,3 / 54 ± 1,0	1,0 / 64 ± 1,1	1,2 / 57 ± 1,0	0,9 / 68 ± 1,7

*Média de duplicata, desvio padrão (n=2).

Através da análise dos cromatogramas m/z 191 também se observou a degradação preferencial de hopanos (**picos 30-38**, Figuras 54 e 55, Tabela 22) em relação aos terpanos tricíclicos (**picos 16-18, 20-22 e 25**, Figuras 54 e 55, Tabela 22) para ambos os consórcios, porém a biodegradação foi menos pronunciada quando comparada ao primeiro ensaio. Os terpanos tricíclicos TT C₂₃-C₃₁ apresentaram taxas de biodegradação de 11 a 20 % com Co1 e de 6 a 19 % com Co2 ambos no período de 60 dias. Neste ensaio também houve preferência dos epímeros *R* sobre os *S*. O 17 α (H), 21 β (H)-30-hopano (**pico 30**, Figuras 54 e 55, Tabela 22) foi degradado 36 % pelo Co1 e 33 % pelo Co2, aproximadamente 15 % menos biodegradado comparado ao primeiro ensaio. Os consórcios degradaram preferencialmente os epímeros 22*R* de maior peso molecular [C₃₅*R* (68 %) > C₃₅*S* (59 %) > C₃₄*R* (59 %) > C₃₄*S* (56 %) > C₃₃*R* (56 %) > C₃₃*S* (55 %) > C₃₂*R* (54 %) > C₃₂*S* (46 %) > C₃₁*R* (44 %) > C₃₁*S* (30 %)] para os homohopanos (**picos 32, 35-38**, Figuras 54 e 55, Tabela 22), assim como foi visto no ensaio com P1 disperso no meio. E, semelhantemente, as razões TT aumentaram e o índice de homohopano (IH) diminuiu, evidenciando mais uma vez a degradação preferencial de C₃₅ hopano em condições aeróbias [Tabela 44, pág. 219]. Neste caso, curiosamente, a matriz não aumentou a velocidade do processo e acredita-se que a

atividade enzimática responsável pela degradação dos compostos hopanóides atuante nos microrganismos *Achromobacter* e *Bacillus*, presentes em maior proporção neste consórcio, pode ter sido inibida de alguma forma pela presença de areia como matriz.

Neste ensaio também se analisou a série dos norhopanos através do SIM usando os íons-fragmentos m/z 191 [Figuras 54 e 55] e m/z 177 [Figura 56]. A Tabela 23 exhibe os dados obtidos para a concentração, mostrando o enriquecimento, para a série de norhopanos com P1 adsorvido em areia para Co1 e Co2 em 60 dias.

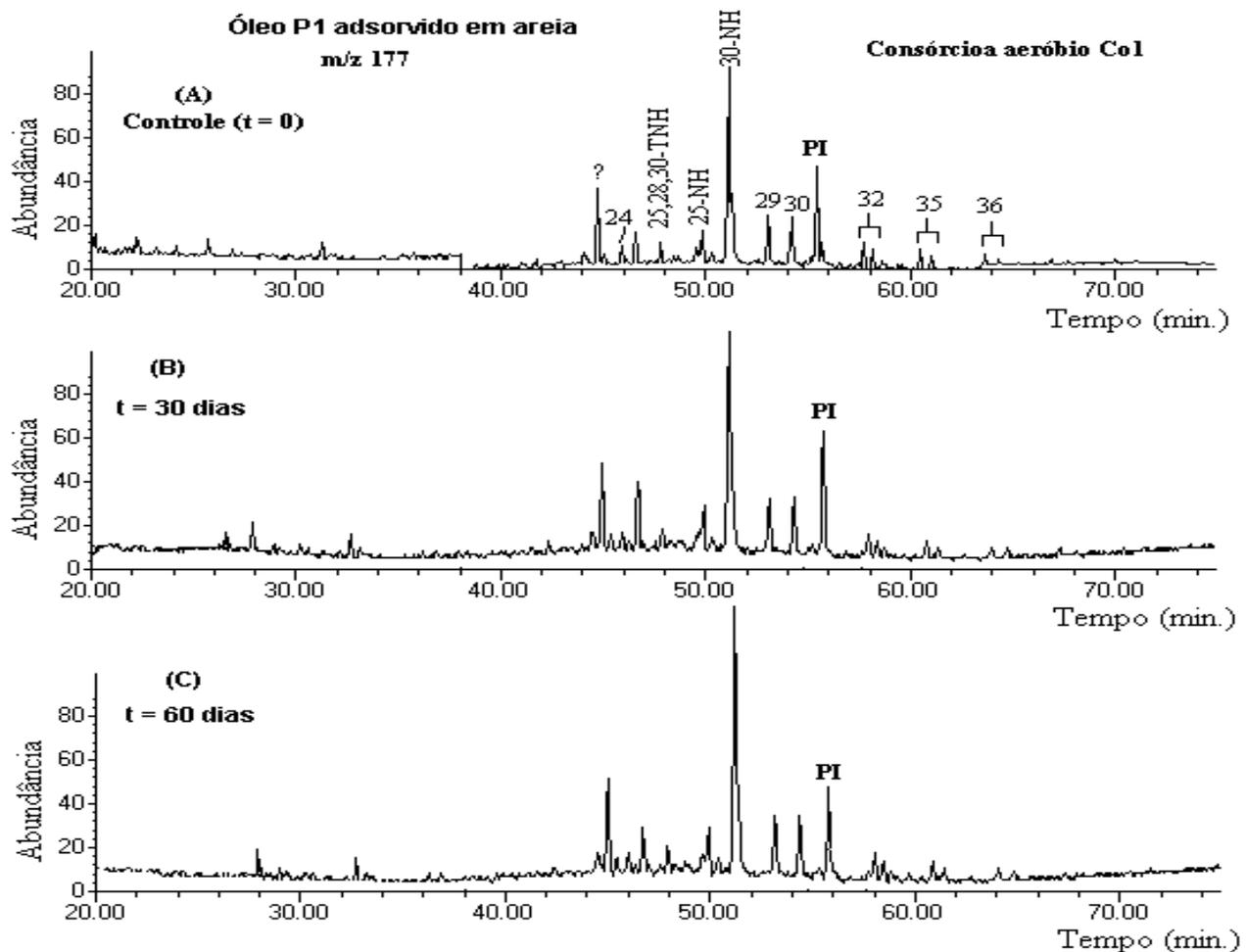


Figura 56. SIM m/z 177 para P1 adsorvido em areia com Co1 em (B) 30 e (C) 60 dias. 25,28,30-TN = $17\alpha(H),18\alpha(H),21\beta(H)-25,28,30$ -trisorhopano; 25-NH = $17\alpha(H),21\beta(H)-25$ -norhopano; 30-NH = $17\alpha(H),21\beta(H)-30$ -norhopano; PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

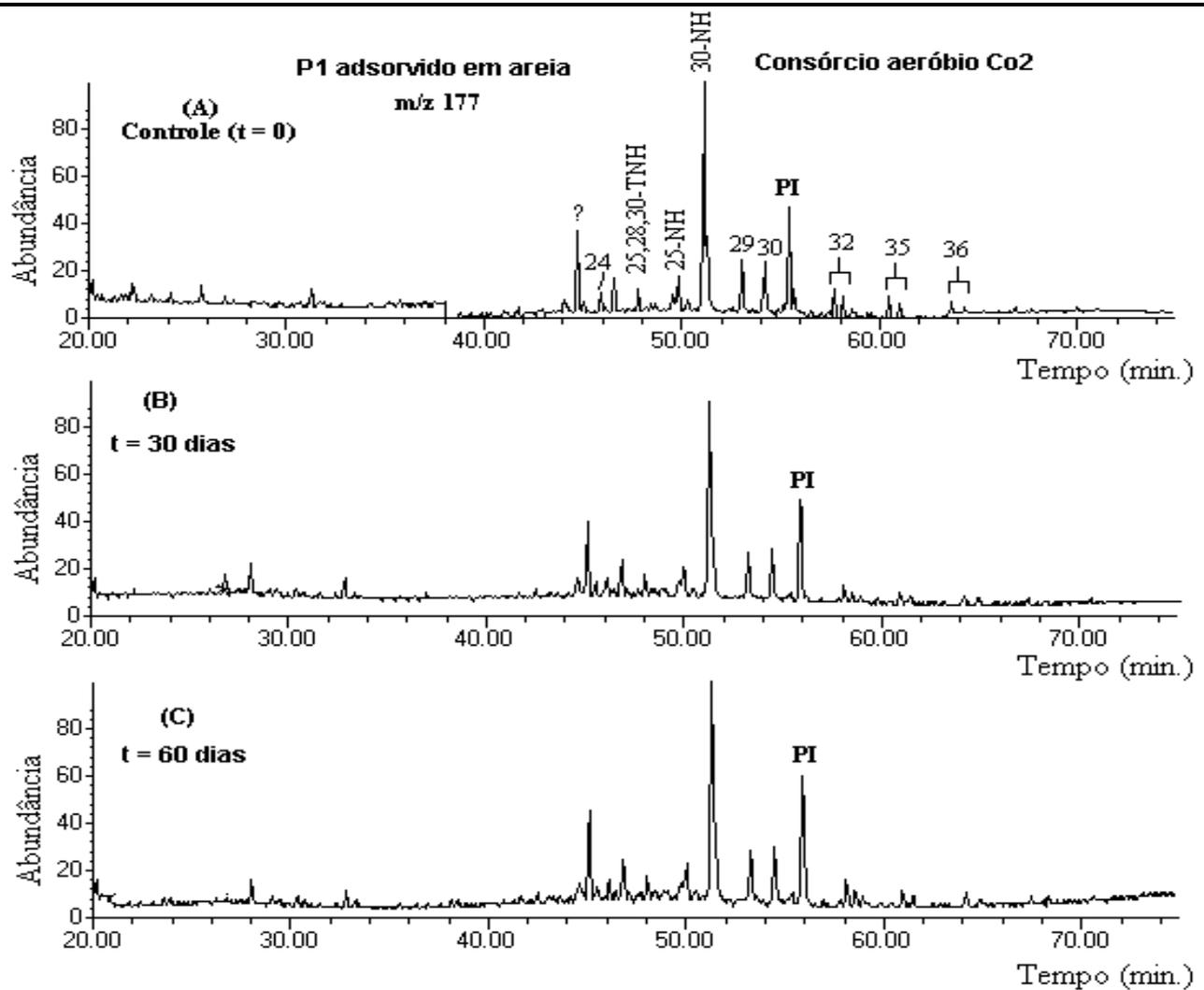


Figura 57. SIM m/z 177 para P1 adsorvido em areia com Co2 em (B) 30 e (C) 60 dias. 25,28,30-TNH = 17 α (H),18 α (H),21 β (H)-25,28,30-trisnorhopano; 25-NH = 17 α (H),21 β (H)-25-norhopano; 30-NH = 17 α (H),21 β (H)-30-norhopano; PI = Padrão Interno (5 α -colestano-3-ona).

Tabela 23. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1), mostrando o enriquecimento, para a série de norhopanos detectados através do SIM em m/z 191 e 177 com P1 adsorvido em areia para Co1 e Co2

Pico	Compostos	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) (controle, $t = 0$)	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) ($t = 60$ dias)	
			Co1	Co2
- ^a	17 α (H),18 α (H),21 β (H)- 25,28,30-trisnorhopano	3,7 \pm 2,3	3,8 \pm 1,9	3,9 \pm 3,2
26 ^b	17 α (H),18 α (H),21 β (H)- 28,30-bisnorhopano	4,6 \pm 1,7	4,8 \pm 3,1	4,8 \pm 3,2
27 ^c	17 α (H),21 β (H)-25-norhopano	3,8 \pm 1,9	3,9 \pm 1,9	4,1 \pm 1,7
28 ^d	17 α (H),21 β (H)-30-norhopano	70,2 \pm 2,2	82,4 \pm 1,4	76,2 \pm 1,8
29 ^e	17 β (H),21 α (H)-normoretano	4,0 \pm 1,4	4,2 \pm 1,2	4,1 \pm 1,6

^a17 α (H),18 α (H),21 β (H)-25,28,30-trisnorhopano em m/z 177; ^b17 α (H),18 α (H),21 β (H)-28,30-bisnorhopano em m/z 191;

^c17 α (H),21 β (H)-25-norhopano em m/z 191 e 177; ^d17 α (H),21 β (H)-30-norhopano em m/z 191 e 177; ^e17 β (H),21 α (H)-normoretano em m/z 191 e 177.

Comparando os resultados obtidos a partir da análise dos íons-fragmentos m/z 191 e m/z 177, observou-se que no experimento com P1 disperso no meio os hopanos foram em média 71 % degradados e no ensaio com petróleo adsorvido em areia a degradação foi de 48 %. Esta degradação ocorreu com concomitante enriquecimento da série de norhopanos para ambos os ensaios, sendo que no experimento com óleo disperso no meio o enriquecimento variou de 11 a 28 % e no experimento com areia a variação foi de 3 a 17 %, mostrando que a biodegradação dos hopanos pode estar contribuindo para o enriquecimento dos norhopanos, porém ainda não é possível afirmar a verdadeira origem desses compostos.

3.2.1.2.4 Esteranos Regulares

As **Figuras 58** e **59** apresentam os cromatogramas obtidos através da técnica SIM m/z 217 para o Co1 e Co2, respectivamente, com o petróleo adsorvido em areia para 30 e 60 dias. A concentração em $\mu\text{g/g}$ F1 e as taxas de biodegradação calculadas para este experimento com ambos os consórcios, estão descritas na **Tabela 24**.

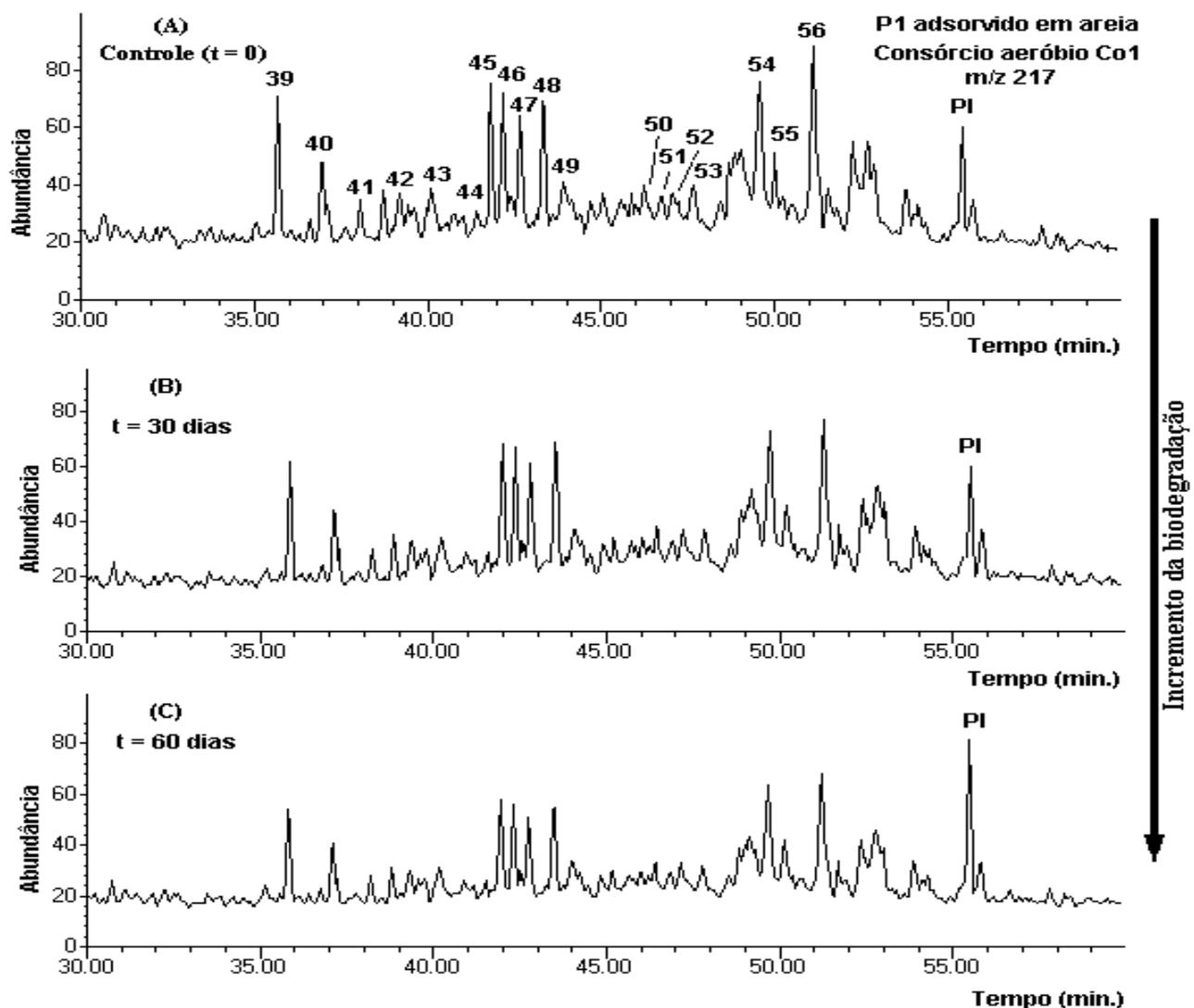


Figura 58. SIM m/z 217 para P1 adsorvido em areia mostrando o incremento da biodegradação de esteranos normais e diasteranos com Co1 em (B) 30 e (C) 60 dias. PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

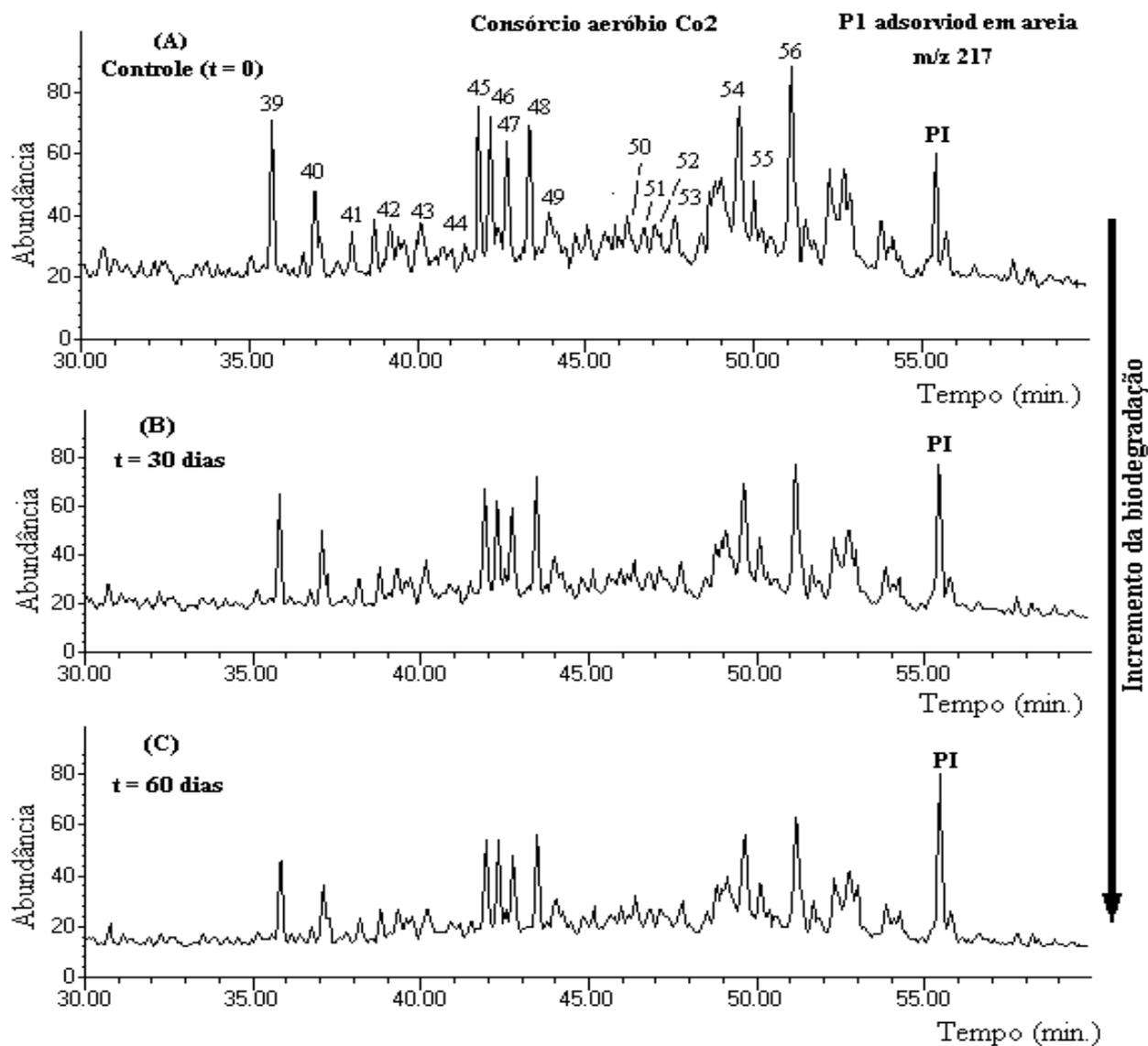


Figura 59. SIM de m/z 217 para PI adsorvido em areia mostrando o incremento da biodegradação de esteranos normais e diasteranos com Co_2 em **(B)** 30 e **(C)** 60 dias. PI = Padrão Interno (5α -coleston-3-ona).

Tabela 24. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para esteranos em m/z 217 com P1 adsorvido em areia para Co1 e Co2

Pico	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%)*				
	Tempo (dias)				
	0	Co1		Co2	
30		60	30	60	
39	36,4 \pm 1,0	26,6 / 27 \pm 1,2	21,4 / 41 \pm 3,8	25,2 / 31 \pm 2,6	23,0 / 37 \pm 2,5
40	13,8 \pm 2,7	10,8 / 22 \pm 1,0	8,0 / 42 \pm 1,0	10,4 / 25 \pm 1,9	8,4 / 39 \pm 3,2
41	5,8 \pm 3,0	4,5 / 22 \pm 2,0	3,2 / 45 \pm 1,9	4,8 / 17 \pm 2,8	3,3 / 43 \pm 1,4
42	4,9 \pm 3,2	3,5 / 29 \pm 1,0	2,8 / 43 \pm 2,7	3,7 / 24 \pm 3,2	2,9 / 41 \pm 1,1
43	4,6 \pm 0,8	3,3 / 28 \pm 0,4	2,8 / 39 \pm 2,7	3,5 / 24 \pm 1,2	2,9 / 37 \pm 2,6
44	2,5 \pm 2,5	2,1 / 16 \pm 2,7	1,6 / 36 \pm 0,8	2,0 / 20 \pm 1,8	1,7 / 32 \pm 1,5
45	34,2 \pm 2,6	16,4 / 52 \pm 1,4	13,8 / 60 \pm 2,1	16,5 / 52 \pm 1,7	12,9 / 62 \pm 3,2
46	35,1 \pm 2,1	15,4 / 56 \pm 1,2	14,0 / 60 \pm 2,6	16,3 / 54 \pm 1,6	13,6 / 61 \pm 1,0
47	22,1 \pm 2,4	12,6 / 43 \pm 1,4	8,8 / 60 \pm 2,6	12,6 / 43 \pm 3,1	8,5 / 62 \pm 1,7
48	24,6 \pm 2,4	12,2 / 50 \pm 2,0	9,6 / 61 \pm 2,3	11,7 / 52 \pm 2,5	9,4 / 62 \pm 1,0
49	4,5 \pm 1,6	3,4 / 24 \pm 3,8	3,0 / 33 \pm 1,4	3,6 / 20 \pm 1,4	3,1 / 31 \pm 2,2
50	3,3 \pm 2,7	2,1 / 36 \pm 0,9	1,6 / 52 \pm 1,2	2,0 / 39 \pm 1,9	1,7 / 48 \pm 1,5
51	2,1 \pm 1,5	1,2 / 43 \pm 3,1	1,0 / 52 \pm 2,2	1,1 / 48 \pm 1,4	0,9 / 57 \pm 1,8
52	2,4 \pm 2,0	1,7 / 29 \pm 1,4	1,1 / 54 \pm 1,7	1,6 / 33 \pm 1,7	1,1 / 54 \pm 3,1
53	3,6 \pm 1,7	2,4 / 33 \pm 2,2	1,5 / 58 \pm 1,4	2,6 / 28 \pm 2,2	1,4 / 61 \pm 2,0
54	33,8 \pm 1,9	19,3 / 43 \pm 1,9	17,1 / 49 \pm 3,8	20,5 / 39 \pm 2,5	18,6 / 45 \pm 3,1
55	4,0 \pm 2,2	3,2 / 20 \pm 1,4	2,0 / 50 \pm 1,9	3,0 / 25 \pm 1,9	2,2 / 45 \pm 3,0
56	36,1 \pm 1,0	26,4 / 27 \pm 3,2	17,6 / 51 \pm 1,2	26,2 / 27 \pm 1,4	19,1 / 47 \pm 2,2

*Média de duplicata, desvio padrão (n=2).

Neste experimento os esteranos normais e diasteranos foram mais biodegradados que no primeiro experimento, porém observou-se a mesma ordem preferencial de remoção: $\alpha\alpha\alpha$ 20R \gg $\alpha\beta\beta$ 20R + $\alpha\beta\beta$ 20S \geq $\alpha\alpha\alpha$ 20S \gg diasteranos e degradação

seletiva de $C_{27} > C_{28} > C_{29}$ [Figuras 58 e 59, págs. 128 e 129, Tabela 24, pág. 130] para ambos os consórcios aeróbios. Mais uma vez observou-se a remoção preferencial de hopanos (com enriquecimento de 25-norhopanos) antes dos esteranos, levando a um aumento da razão esterano/hopano para ambos os consórcios aeróbios [Tabela 44, pág. 219].

Podemos sugerir, baseado nos resultados obtidos com P1 adsorvido em areia, que a matriz realmente influencia a velocidade do processo de biodegradação devido ao aumento da superfície de contato óleo-água e da presença de minerais presentes na matriz. De acordo com Rogers e Bennett (2004), os microrganismos presentes no consórcio se fixam nas matrizes para obter nutrientes inorgânicos, tais como Fe e P, essenciais para seu crescimento. Ainda segundo esses autores, uma matriz rica em alumínio (Al) impede a colonização e dispersão do consórcio, enquanto a presença de potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) são indiferentes para sua manutenção. Os mesmos autores afirmam que os consórcios se beneficiam também da liberação de nutrientes presentes em matrizes ricas em silicatos (SiO_2), como a areia, levando a um aumento da biomassa e, conseqüentemente, das taxas de biodegradação do petróleo. Este efeito é intensificado quando ambos Fe e P estão presentes. A presença de matrizes que adsorvem o petróleo podem, portanto, desempenhar um papel vital em abundância e viabilidade microbiana influenciando, assim, os parâmetros de biodegradação avaliados.

Outro ponto importante a considerar é que o uso da matriz influenciou a velocidade de biodegradação para algumas classes de biomarcadores (*n*-alcanos, sesquiterpanos bicíclicos e para esteranos) e para outras, como é o caso dos hopanos, não houve influência. Baseado nisto, pode-se sugerir, também, que os microrganismos *Stenotrophomonas* e os clones não cultivados, presentes em menor proporção neste consórcio, também pode estar influenciando no processo de biodegradação e, pode-se dizer, que estes microrganismos não degradam hopanos, uma vez que eles não estão

presentes no consórcio com P1 disperso no meio onde os hopanos foram mais biodegradados.

3.2.1.3 Análise da fração neutra saturada com petróleo adsorvido em folhelhos

A outra matriz utilizada para adsorver o petróleo foram folhelhos coletados em pontos diferentes do reservatório, assim denominados: Folhelho Bateteiras (FB), Folhelho Santana A (FSA) e Folhelho Santana B (FSB).

Os folhelhos são rochas em formato de “folhas” que possuem laminações variando de 0,05 a 1 mm e atuam como rocha selante retendo o petróleo na rocha reservatório impedindo o seu escape para superfície. Os folhelhos são um dos grandes responsáveis por problemas de instabilidade de poços de petróleo quando eles são perfurados, devido à interação entre os fluidos de perfuração e as referidas rochas (Steiger & Leung, 1992; Schmitt et al., 1994). E por isso resolveu-se verificar se estes folhelhos também influenciam no processo de biodegradação do petróleo.

Aqui estão expostos os resultados apenas para os folhelhos FSA e FB, devido à semelhança entre FSA e FSB durante o processo de biodegradação. Os consórcios Co1 e Co2 apresentaram taxas de biodegradação sem diferenças significativas (< 1 %) e por isso aqui discutiu-se apenas os resultados de Co1 com FSA e Co2 com FB, representativo para todos os ensaios.

Quando se utilizou FSA e FSB notou-se que eles apresentaram o mesmo comportamento para todas as classes estudadas e algumas diferenças comparadas ao folhelho FB provavelmente devido à diferença no tamanho dos poros. Acredita-se que o petróleo fica mais adsorvido, dificultando o acesso dos microrganismos, quanto menor for o poro do folhelho. É importante destacar que o tamanho dos poros é uma característica importante para compreender os mecanismos de transporte de água, íons e

nutrientes nestas rochas. Devido a isso, fez-se análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difratometria de raios X com o intuito de visualizar a microestrutura e composição química dos folhelhos estudados.

Inicialmente os folhelhos foram macerados e submetidos à extração com solvente para retirada da matéria orgânica, realizado no grupo da Profa Dra Luzia Koike. Após este processo os folhelhos foram submetidos aos estudos de biodegradação.

A observação direta da microestrutura pode ser visualizada pelas imagens obtidas por MEV como mostra a **Figura 60**.

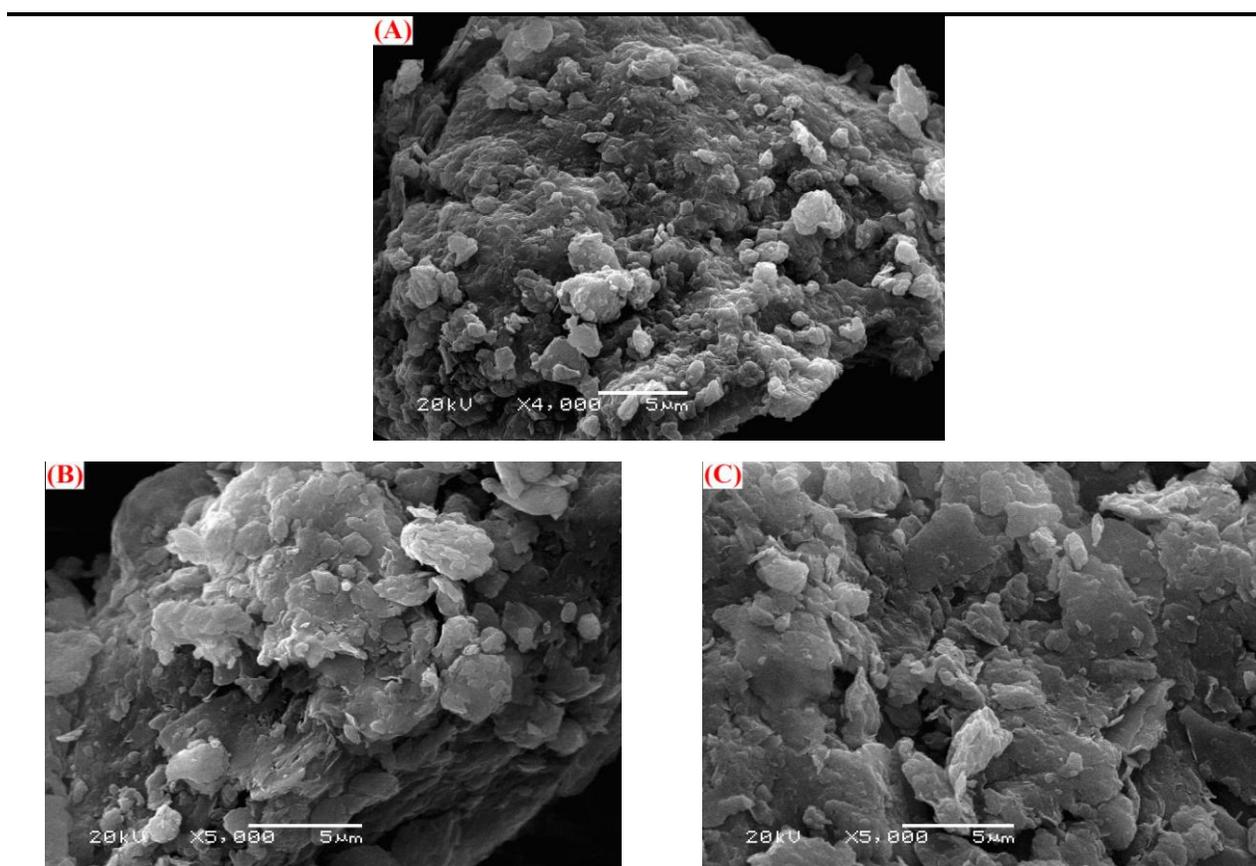


Figura 60. MEV para os folhelhos (A) FB; (B) FSA e (C) FSB utilizados como matrizes nos ensaios de biodegradação.

Observa-se pela imagem que os folhelhos FSA e FSB apresentam semelhanças no tamanho e orientação dos minerais, diferente do folhelho FB que apresenta menor tamanho dos poros.

A identificação dos minerais presentes nos folhelhos foi obtida através de análise semi-quantitativa por MEV e por métodos de difração de Raios-X.

A **Figura 61** apresenta os gráficos da composição química obtidos por MEV.

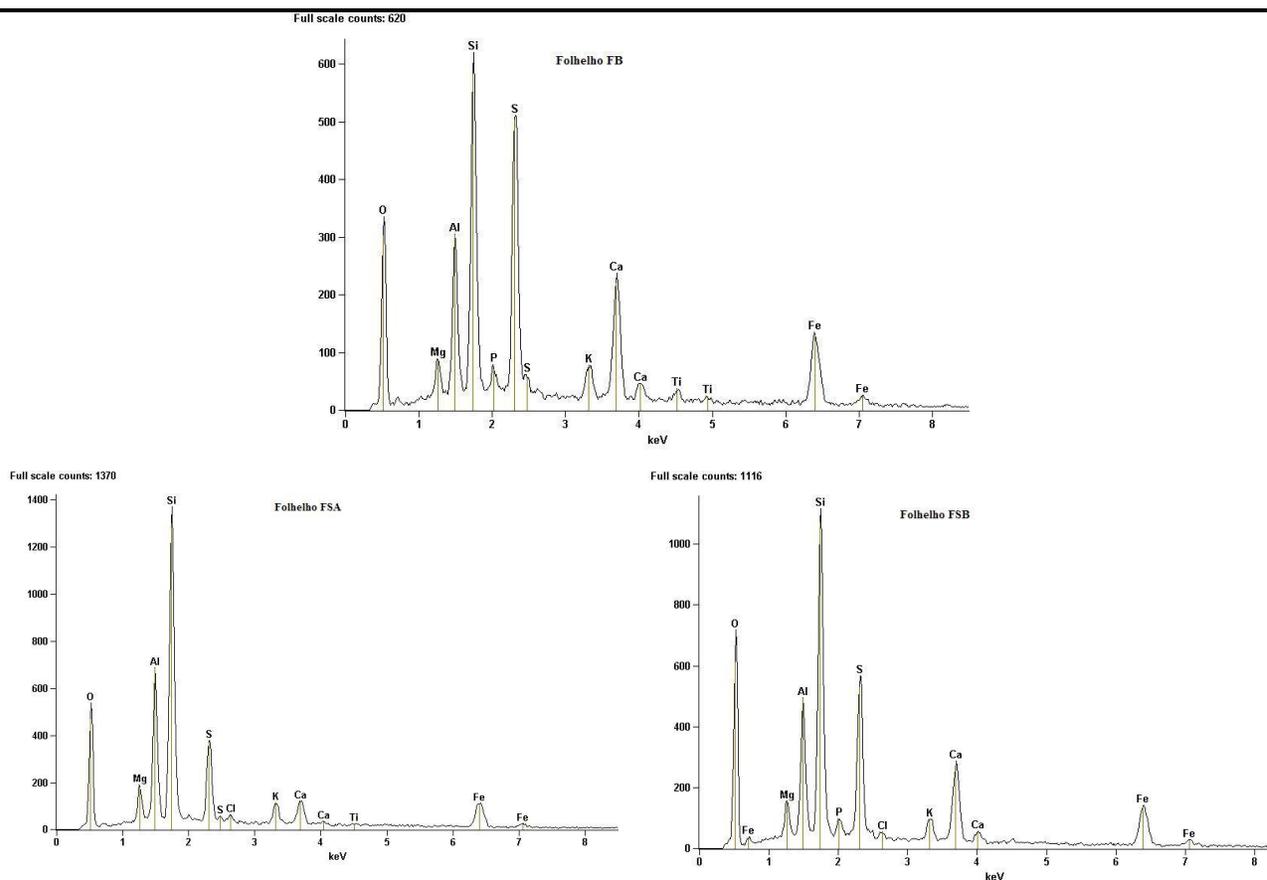


Figura 61. Gráficos obtidos por MEV mostrando a composição dos folhelhos FB, FSA e FSB.

A composição química é obtida através das quantidades dos óxidos presentes nos folhelhos. Na **Tabela 25** encontra-se os resultados das análises químicas obtida para os três folhelhos estudados.

Tabela 25. Composição química dos folhelhos FB, FSA e FSB (% em peso)

Elemento	% em peso		
	FB	FSA	FSB
SiO ₂	51,51	46,16	46,87
MgO	0,68	1,96	1,53
Al ₂ O ₃	8,83	11,36	12,78
P ₂ O ₅	0,98	0,65	1,85
K ₂ O	2,83	1,75	1,50
CaO	16,48	11,30	13,46
Fe ₂ O ₃	11,45	7,92	8,00
FeS ₂	35,75	23,56	16,67
CaSO ₄	22,51	14,72	19,61

Os resultados mostram que os três folhelhos são ricos em silicatos, aluminatos (base de folhelhos argilominerais), em cálcio (indicando a presença de calcita nas matrizes) e ferro, variando em peso com maior semelhança entre os folhelhos FSA e FSB.

Os itens a seguir tratam da biodegradação das diversas classes de biomarcadores, utilizando estes folhelhos como matrizes para adsorver o petróleo. Os microrganismos responsáveis por esta biodegradação são os mesmos relatados para o consórcio aeróbio com P1 direto no meio, isto é, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium* e *Mezorhizobium*.

3.2.1.3.1 n-alcenos e isoprenóides

As **Figuras 62 e 63** mostram o incremento da biodegradação dos *n*-alcenos e isoprenóides com Co1 e P1 adsorvido no folhelho FSA e para o Co2 com P1 adsorvido no folhelho FB, respectivamente. As taxas de biodegradação obtidas para estes ensaios encontram-se na **Tabela 26**.

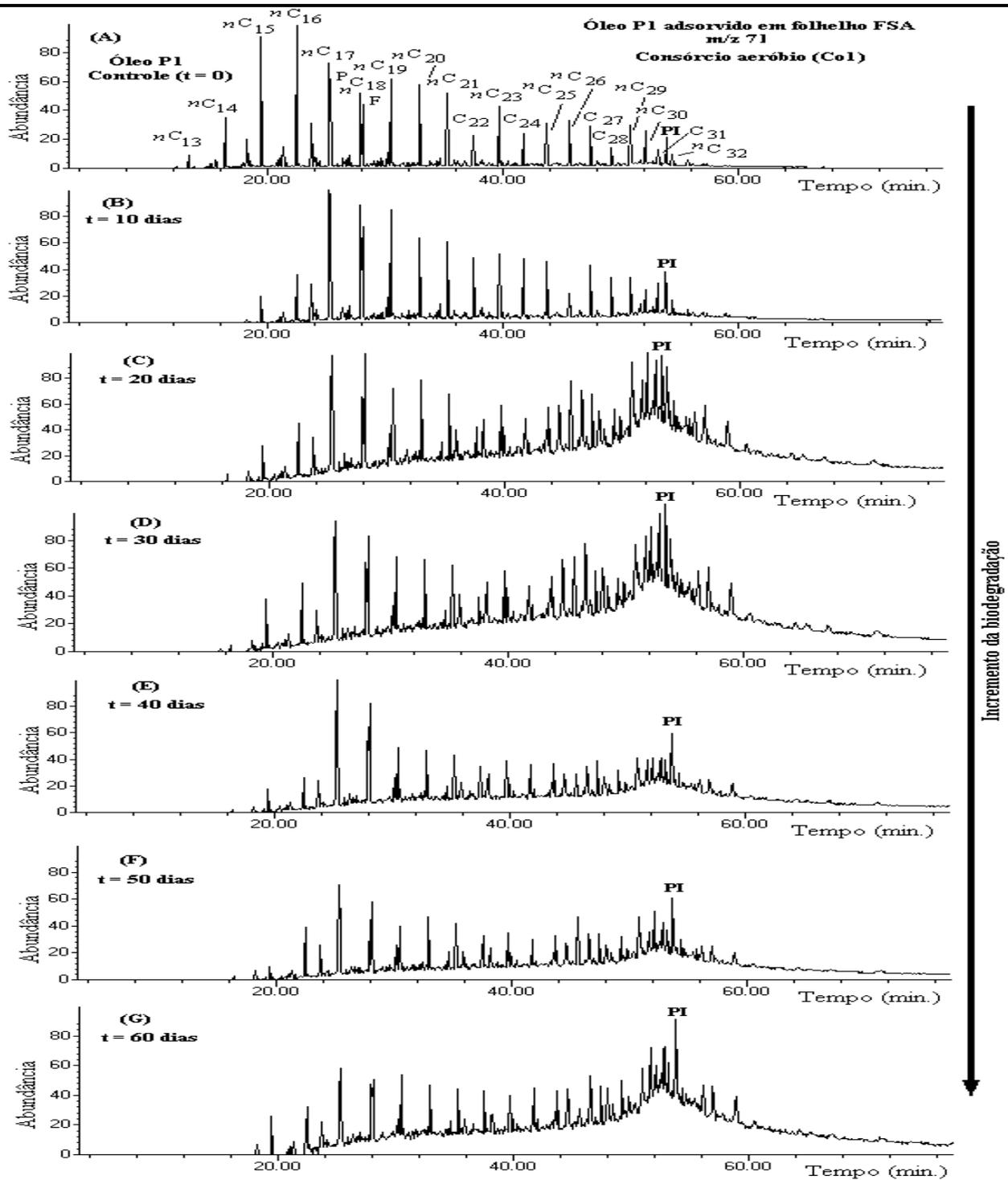


Figura 62. RIC m/z 71 para monitorar a biodegradação de P1 adsorvido em folheto FSA pelo Co1. nC_{13} - nC_{32} = n -alcanos; P = Pristano; F = Fitano; PI = Padrão Interno (5 α -colestano-3-ona).

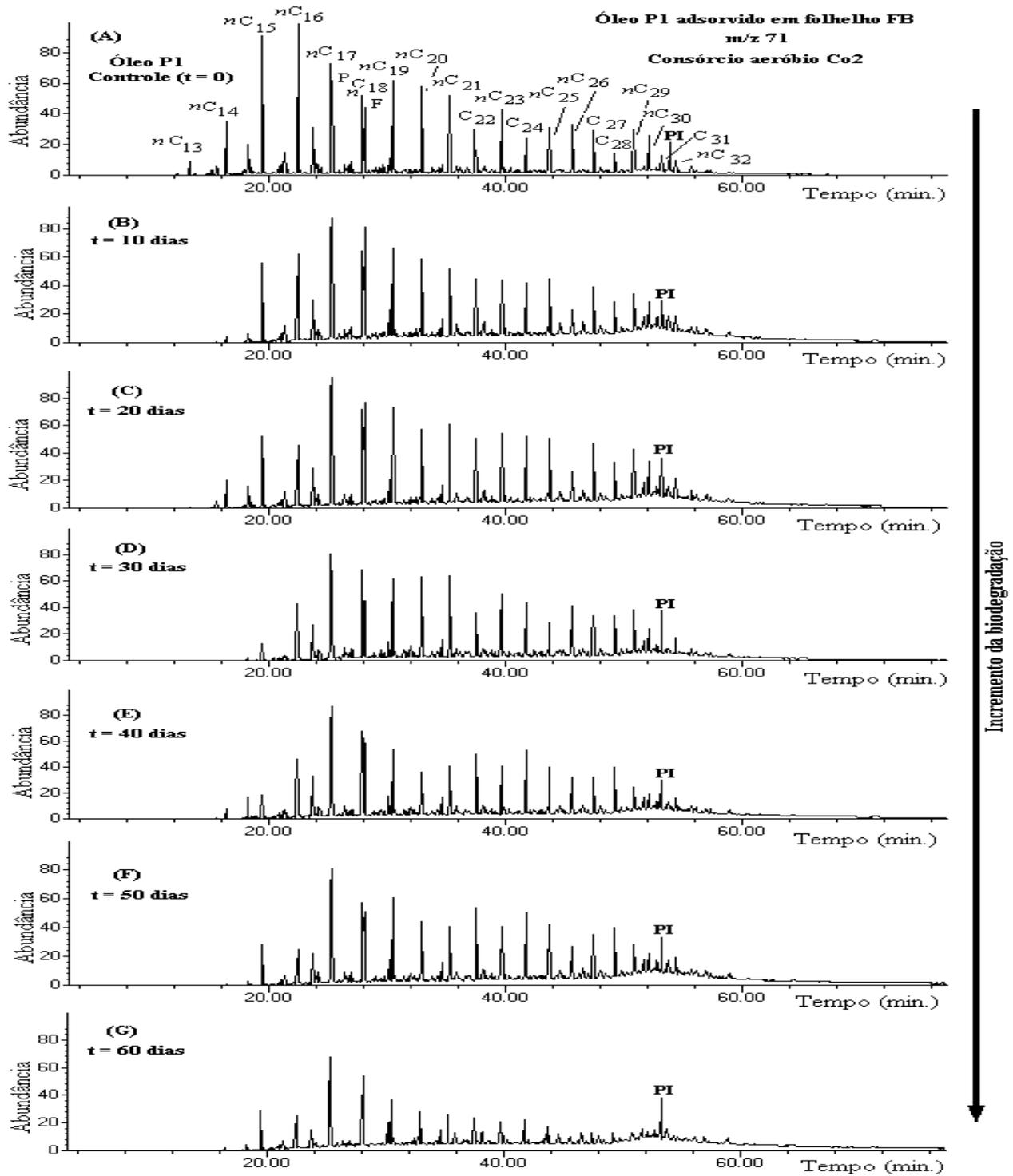


Figura 63. RIC m/z 71 para monitorar a biodegradação de P1 adsorvido em folhelho FB pelo Co2.

nC_{13} - nC_{32} = n -alcanos; P = Pristano; F = Fitano; PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

Tabela 26. Taxas de biodegradação (%) para *n*-alcanos e isoprenóides utilizando P1 adsorvido em folhelho FSA com Co1

Pico	Composto	Fórmula	MM ^a	Taxas de biodegradação (%) ^b /Tempo (dias)					
				10	20	30	40	50	60
<i>n</i> C ₁₃	<i>n</i> -Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	184	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₄	<i>n</i> -Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀	198	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₅	<i>n</i> -Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	212	66 ± 1,2	90 ± 1,0	90 ± 1,8	91 ± 1,3	95 ± 1,0	96 ± 0,9
<i>n</i> C ₁₆	<i>n</i> -Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	226	54 ± 1,5	90 ± 0,7	91 ± 2,6	94 ± 2,2	94 ± 1,0	95 ± 1,6
<i>n</i> C ₁₇	<i>n</i> -Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	240	52 ± 1,4	79 ± 2,1	89 ± 1,3	92 ± 1,1	95 ± 2,5	96 ± 2,1
P	Pristano	C ₁₉ H ₄₀	268	50 ± 1,1	78 ± 2,2	88 ± 2,1	91 ± 1,4	94 ± 1,6	94 ± 0,6
<i>n</i> C ₁₈	<i>n</i> -Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	254	26 ± 1,3	88 ± 2,5	92 ± 1,8	95 ± 2,5	96 ± 1,4	97 ± 0,8
F	Fitano	C ₂₀ H ₄₂	282	24 ± 1,0	52 ± 3,4	70 ± 2,1	76 ± 2,6	78 ± 1,7	88 ± 2,0
<i>n</i> C ₁₉	<i>n</i> -Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	268	7 ± 1,0	83 ± 2,7	84 ± 3,1	90 ± 2,2	91 ± 1,2	94 ± 1,8
<i>n</i> C ₂₀	<i>n</i> -Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	282	24 ± 0,9	84 ± 1,1	88 ± 2,7	90 ± 1,3	92 ± 1,4	94 ± 1,3
<i>n</i> C ₂₁	<i>n</i> -Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	296	20 ± 2,0	85 ± 0,9	85 ± 1,0	89 ± 1,8	90 ± 1,2	96 ± 1,2
<i>n</i> C ₂₂	<i>n</i> -Docosano	C ₂₂ H ₄₆	310	36 ± 1,2	87 ± 1,9	88 ± 2,0	90 ± 2,0	93 ± 1,7	96 ± 1,5
<i>n</i> C ₂₃	<i>n</i> -Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	324	3 ± 2,3	83 ± 1,5	83 ± 2,2	90 ± 2,1	94 ± 2,2	96 ± 2,5
<i>n</i> C ₂₄	<i>n</i> -Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	338	23 ± 1,4	83 ± 2,3	84 ± 1,9	86 ± 1,7	89 ± 2,4	93 ± 1,2
<i>n</i> C ₂₅	<i>n</i> -Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	352	14 ± 1,6	23 ± 1,8	71 ± 1,5	77 ± 1,4	81 ± 1,7	94 ± 0,8
<i>n</i> C ₂₆	<i>n</i> -Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	366	41 ± 2,5	76 ± 1,0	81 ± 0,8	82 ± 1,2	83 ± 1,6	94 ± 0,7
<i>n</i> C ₂₇	<i>n</i> -Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	380	21 ± 3,6	74 ± 1,5	82 ± 1,4	82 ± 0,8	88 ± 0,8	92 ± 2,1
<i>n</i> C ₂₈	<i>n</i> -Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	394	17 ± 2,1	57 ± 2,3	63 ± 0,8	78 ± 1,4	86 ± 1,9	86 ± 2,2
<i>n</i> C ₂₉	<i>n</i> -Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	408	4 ± 2,0	5 ± 1,2	14 ± 1,3	18 ± 1,6	40 ± 2,2	nd
<i>n</i> C ₃₀	<i>n</i> -Triacontano	C ₃₀ H ₆₂	422	36 ± 2,6	39 ± 2,1	41 ± 1,1	44 ± 1,3	57 ± 1,2	64 ± 1,3
<i>n</i> C ₃₁	<i>n</i> -Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	436	33 ± 1,4	48 ± 2,0	52 ± 1,4	54 ± 2,2	66 ± 0,7	69 ± 1,2
<i>n</i> C ₃₂	<i>n</i> -Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆	450	7 ± 1,5	54 ± 2,5	61 ± 1,5	67 ± 1,1	72 ± 1,2	nd

^aMM = Massa Molecular; ^bMédia de duplicata, desvio padrão (n=2).

Tabela 27. Taxas de biodegradação (%) para *n*-alcanos e isoprenóides utilizando P1 adsorvido em folhelho FB com Co2

Pico	Composto	Fórmula	MM ^a	Taxas de biodegradação (%) ^b /Tempo (dias)					
				10	20	30	40	50	60
<i>n</i> C ₁₃	<i>n</i> -Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	184	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₄	<i>n</i> -Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀	198	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₅	<i>n</i> -Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	212	20 ± 2,0	23 ± 2,1	39 ± 2,0	48 ± 3,8	94 ± 2,3	95 ± 2,5
<i>n</i> C ₁₆	<i>n</i> -Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	226	10 ± 1,0	34 ± 2,3	34 ± 2,3	64 ± 4,2	93 ± 5,0	94 ± 2,3
<i>n</i> C ₁₇	<i>n</i> -Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	240	22 ± 2,2	53 ± 1,4	60 ± 1,5	85 ± 2,0	92 ± 3,	95 ± 1,9
P	Pristano	C ₁₉ H ₄₀	268	12 ± 1,2	52 ± 3,2	65 ± 4,0	76 ± 1,4	91 ± 2,2	93 ± 1,5
<i>n</i> C ₁₈	<i>n</i> -Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	254	12 ± 1,6	48 ± 2,5	59 ± 0,9	71 ± 0,9	96 ± 1,1	96 ± 3,1
F	Fitano	C ₂₀ H ₄₂	282	2 ± 0,9	30 ± 1,6	56 ± 2,6	64 ± 0,8	73 ± 0,5	85 ± 1,2
<i>n</i> C ₁₉	<i>n</i> -Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	268	7 ± 0,7	29 ± 2,6	49 ± 2,4	50 ± 1,2	84 ± 2,2	92 ± 0,6
<i>n</i> C ₂₀	<i>n</i> -Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	282	20 ± 2,0	20 ± 1,2	41 ± 1,9	62 ± 3,0	94 ± 1,2	95 ± 3,2
<i>n</i> C ₂₁	<i>n</i> -Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	296	2 ± 1,2	23 ± 1,6	55 ± 3,1	61 ± 0,9	93 ± 1,5	95 ± 2,5
<i>n</i> C ₂₂	<i>n</i> -Docosano	C ₂₂ H ₄₆	310	2 ± 3,0	26 ± 3,6	31 ± 2,5	72 ± 1,1	91 ± 1,6	94 ± 0,9
<i>n</i> C ₂₃	<i>n</i> -Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	324	10 ± 3,0	21 ± 2,2	41 ± 1,4	61 ± 2,2	62 ± 1,1	90 ± 0,8
<i>n</i> C ₂₄	<i>n</i> -Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	338	11 ± 1,1	15 ± 1,6	45 ± 2,1	75 ± 1,4	89 ± 1,0	92 ± 2,3
<i>n</i> C ₂₅	<i>n</i> -Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	352	12 ± 1,1	23 ± 1,4	55 ± 3,9	73 ± 0,6	73 ± 0,8	91 ± 1,8
<i>n</i> C ₂₆	<i>n</i> -Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	366	7 ± 0,8	36 ± 0,8	54 ± 1,5	81 ± 1,4	83 ± 1,3	90 ± 0,6
<i>n</i> C ₂₇	<i>n</i> -Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	380	< 1 ± 1,0	4 ± 0,6	44 ± 1,4	81 ± 0,8	83 ± 1,8	90 ± 2,6
<i>n</i> C ₂₈	<i>n</i> -Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	394	10 ± 2,6	14 ± 1,5	33 ± 3,2	74 ± 1,9	86 ± 1,6	86 ± 2,0
<i>n</i> C ₂₉	<i>n</i> -Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	408	18 ± 1,9	20 ± 1,4	34 ± 1,3	44 ± 1,1	52 ± 1,9	66 ± 3,0
<i>n</i> C ₃₀	<i>n</i> -Triacontano	C ₃₀ H ₆₂	422	20 ± 0,9	34 ± 2,0	35 ± 1,4	47 ± 1,0	61 ± 2,3	65 ± 1,1
<i>n</i> C ₃₁	<i>n</i> -Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	436	14 ± 2,4	34 ± 2,4	42 ± 1,2	53 ± 0,6	62 ± 3,1	66 ± 1,5
<i>n</i> C ₃₂	<i>n</i> -Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆	450	6 ± 3,3	46 ± 2,2	58 ± 2,3	65 ± 2,0	68 ± 3,0	74 ± 2,1

^aMM = Massa Molecular; ^bMédia de duplicata, desvio padrão (n=2)..

A partir da análise dos cromatogramas de m/z 71, nota-se que quando se utiliza FSA como matriz, existe uma semelhança com o ensaio que se utilizou P1 adsorvido em areia, e quando se utiliza FB nota-se a semelhança com o ensaio que utiliza P1 disperso no meio, porém ambos apresentam menor velocidade de biodegradação. Isto pode ser justificado pelo fato de que os folhelhos apresentam laminações muito pequenas (varia de 0,05 a 1 mm) e o petróleo pode estar sendo adsorvido no seu interior dificultando o acesso dos microrganismos.

Em 60 dias de ensaio observou-se que a série homóloga de n -alcanos e os isoprenóides P e F foram biodegradados aproximadamente na mesma proporção para ambos os consórcios, com taxas variando de 64 a 96 % com Co1 e de 65 a 96 % com Co2, sendo que no início do experimento (10 a 30 dias) com FSA e Co1 houve uma maior aceleração da velocidade de biodegradação, comparada ao experimento com FB e Co2.

Assim como ocorreu no primeiro (P1 disperso no meio) e segundo (P1 adsorvido em areia) ensaios, aqui também observou-se a degradação de n -alcanos antes dos isoprenóides, para ambos os consórcios, resultando no aumento das razões P/nC_{17} e F/nC_{18} e na diminuição da razão P/F [Tabela 43, *pág. 213*]. Semelhantemente, o IPC apresentou valores < 1 durante o processo de biodegradação, evidenciando mais uma vez que em condições aeróbias existe preferência par-ímpar com o progresso da biodegradação [Tabela 43].

3.2.1.3.2 Sesquiterpanos Bicíclicos

Os sesquiterpanos bicíclicos foram severamente biodegradados pelo Co1 com P1 adsorvido em FSA em 40 dias [Figura 64]. Com 60 dias eles foram completamente biodegradados. Já o Co2 no ensaio com FB como matriz, apresentou uma menor velocidade de biodegradação [Figura 65].

Nesse experimento a biodegradação dos bicíclicos foi mais pronunciada que nos experimentos anteriores. É importante destacar a alta resistência do composto $8\beta(H)$ -homodrimano, que foi menos biodegradado que os demais bicíclicos.

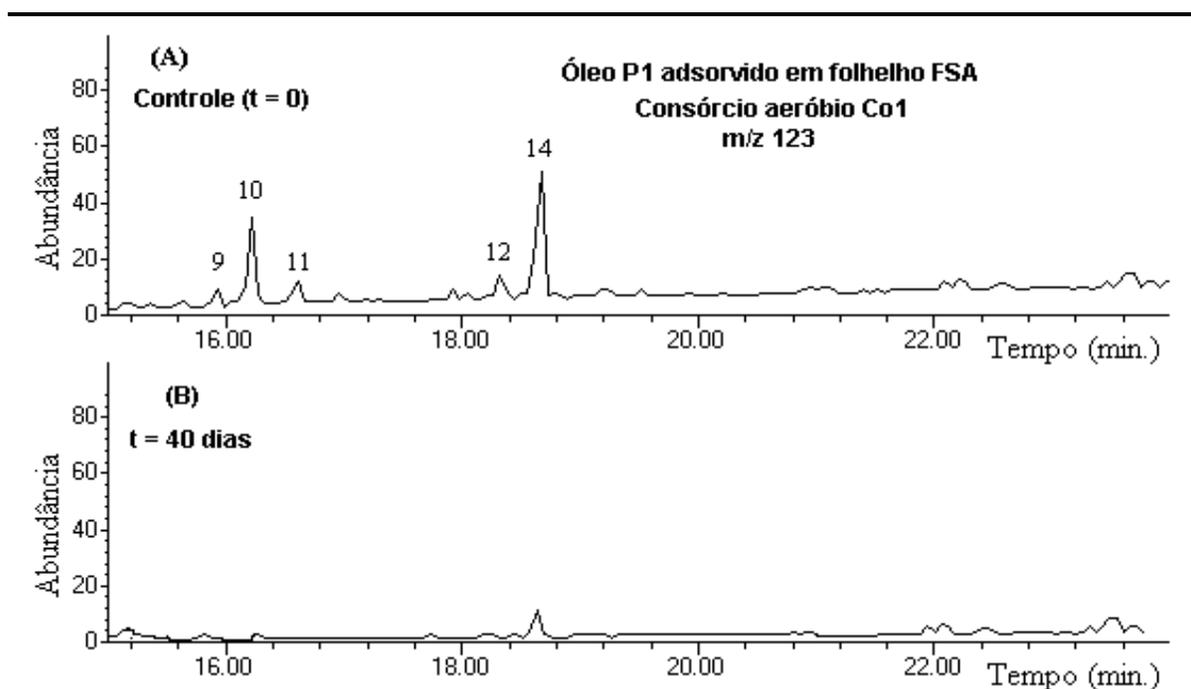


Figura 64. Sesquiterpanos bicíclicos monitorados através do íon m/z 123 no ensaio com P1 adsorvido em FSA com Co1 em 40 dias.

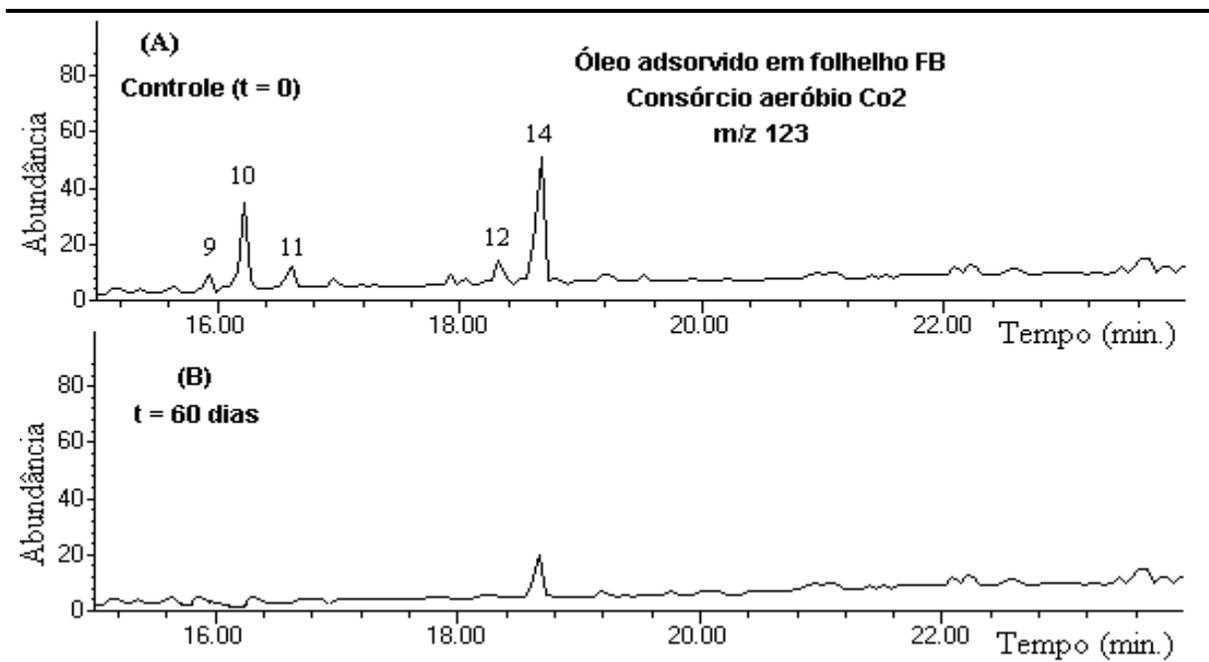


Figura 65. Sesquiterpanos bicíclicos monitorados através do íon m/z 123 no ensaio com P1 adsorvido em FB com Co2 em 60 dias.

3.2.1.3.3 Terpanos Tricíclicos, Tetracíclicos e Pentacíclicos

As **Figuras 66** e **67** apresentam os cromatogramas obtidos para os terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos através do SIM para o íon-fragmento m/z 191 com Co1 e Co2 para P1 adsorvido em FSA e FB, respectivamente.

A **Tabela 28** mostra a concentração em $\mu\text{g/g}$ F1 e as taxas de biodegradação calculadas para ambos os consórcios em 30 e 60 dias de ensaio.

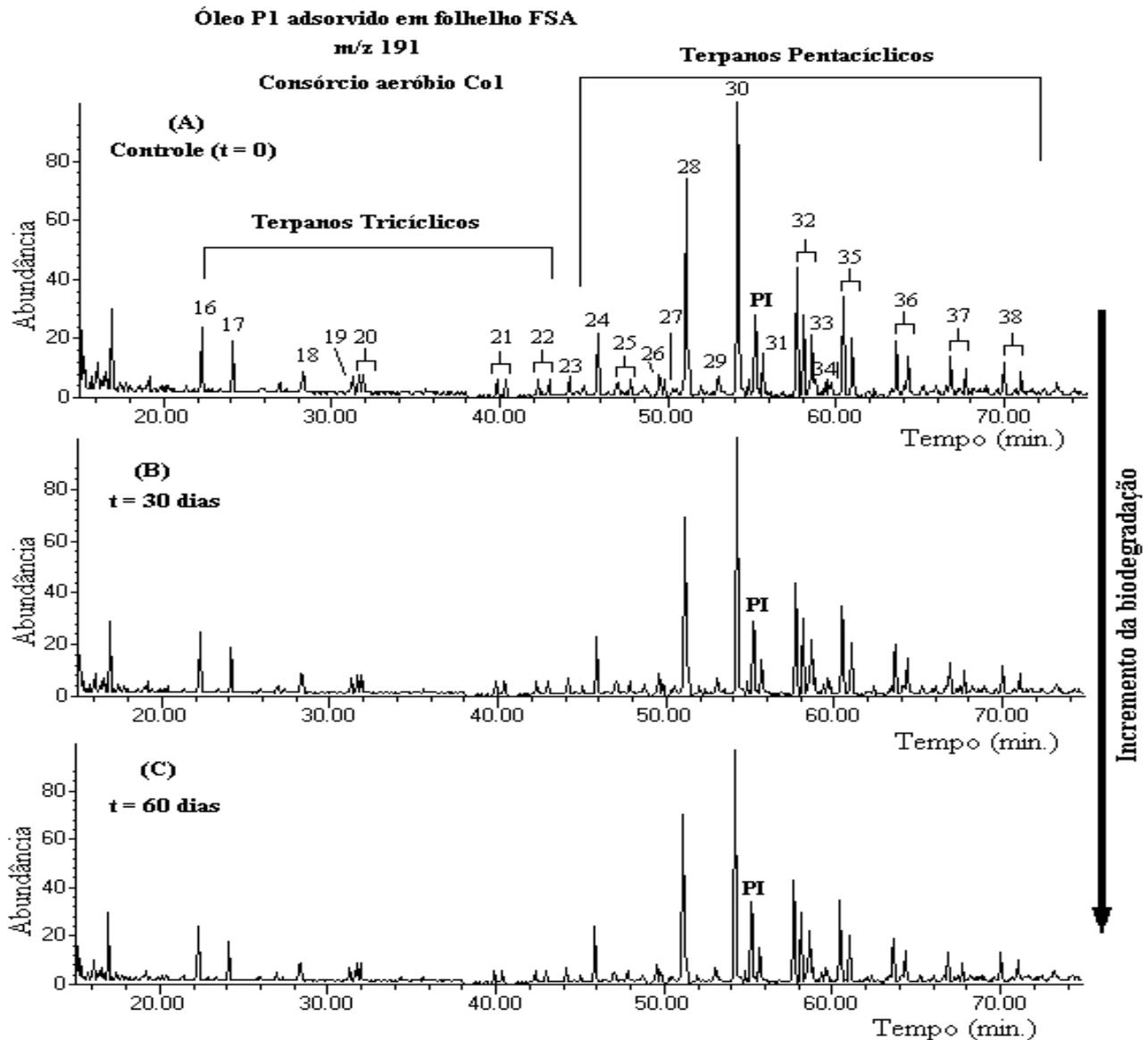


Figura 66. SIM m/z 191 para P1 adsorvido em folhelho FSA mostrando a biodegradação de terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos com Co1. PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

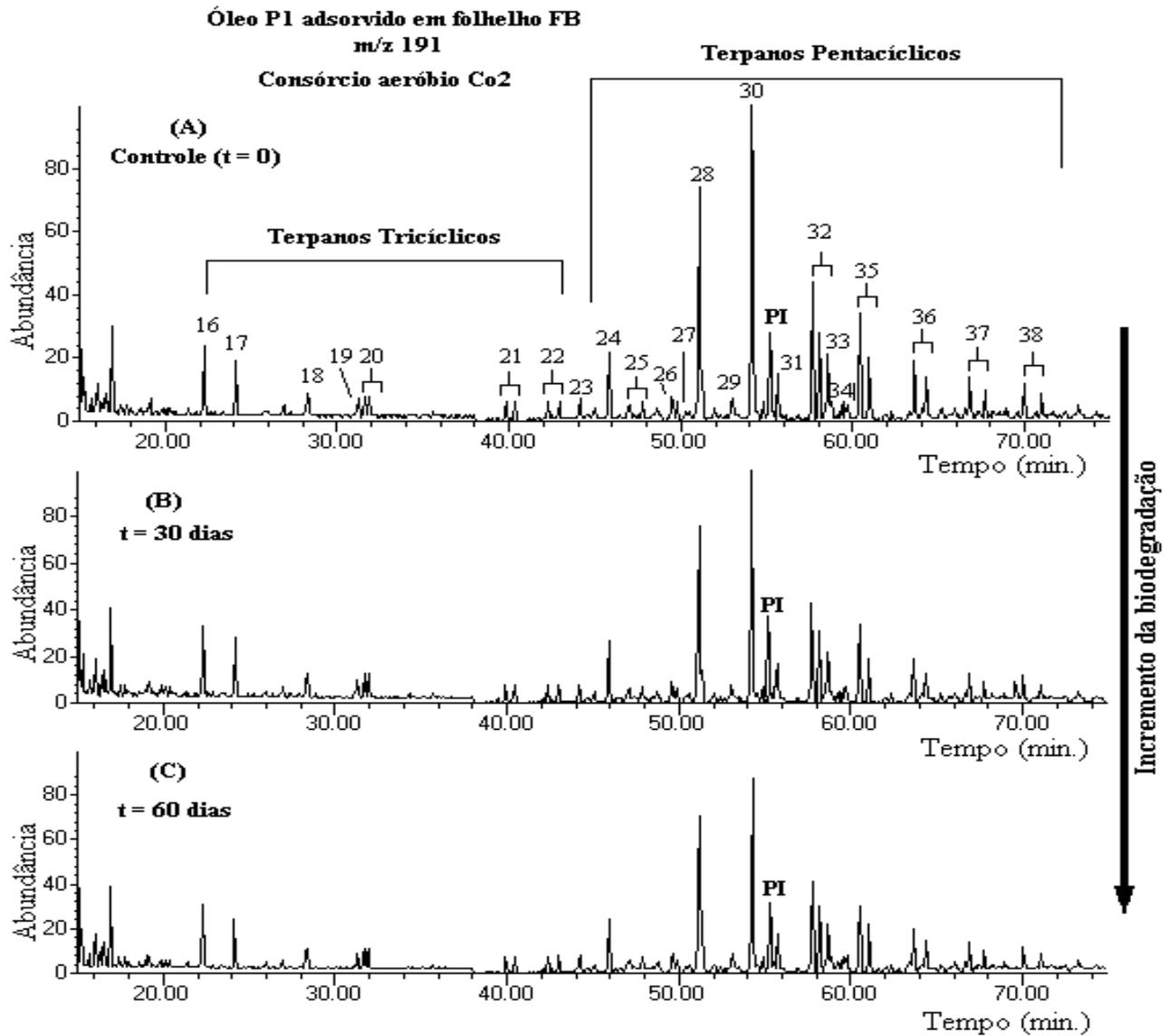


Figura 67. SIM m/z 191 para P1 adsorvido em folhelho FB mostrando a biodegradação de terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos com Co₂. PI = Padrão Interno (5 α -colestano-3-ona).

Tabela 28. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos monitorando m/z 217 com P1 adsorvido em folhelhos FSA e FB para Co1 e Co2, respectivamente

Pico	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%)*				
	Tempo (dias)				
	FSA/Co1			FB/Co2	
	0	30	60	30	60
16	33,0 \pm 3,0	28,1 / 15 \pm 1,0	27,5 / 17 \pm 1,5	27,7 / 16 \pm 1,0	27,4 / 17 \pm 0,9
17	16,5 \pm 1,0	14,6 / 12 \pm 1,2	13,0 / 21 \pm 2,2	13,1 / 21 \pm 1,5	12,8 / 22 \pm 1,8
18	5,9 \pm 2,7	5,4 / 8 \pm 1,8	4,7 / 20 \pm 1,0	5,2 / 12 \pm 1,0	4,7 / 20 \pm 2,4
19	4,8 \pm 3,8	4,3 / 10 \pm 1,4	3,9 / 19 \pm 1,1	4,2 / 13 \pm 1,1	4,0 / 17 \pm 1,3
20S	6,0 \pm 3,2	5,4 / 10 \pm 1,5	4,7 / 22 \pm 1,7	5,3 / 12 \pm 1,3	4,5 / 25 \pm 1,3
20R	6,1 \pm 0,8	5,4 / 11 \pm 1,2	4,6 / 25 \pm 0,4	5,4 / 11 \pm 0,5	4,5 / 26 \pm 0,9
21S	5,3 \pm 2,1	4,4 / 17 \pm 0,9	4,1 / 23 \pm 1,2	4,4 / 17 \pm 1,1	4,0 / 25 \pm 0,6
21R	5,9 \pm 2,6	4,6 / 22 \pm 1,5	4,5 / 24 \pm 1,4	4,6 / 22 \pm 1,0	4,3 / 27 \pm 0,8
22S	4,9 \pm 2,4	4,0 / 18 \pm 1,1	3,9 / 20 \pm 1,4	4,0 / 18 \pm 1,3	3,7 / 24 \pm 0,6
22R	5,2 \pm 2,4	4,3 / 17 \pm 0,9	4,1 / 23 \pm 1,7	4,2 / 19 \pm 1,2	3,9 / 25 \pm 0,9
23	5,4 \pm 1,6	4,8 / 11 \pm 0,6	4,0 / 26 \pm 1,5	4,6 / 15 \pm 1,6	3,9 / 28 \pm 2,2
24	15,6 \pm 2,7	13,8 / 12 \pm 1,2	11,3 / 28 \pm 2,5	13,4 / 14 \pm 2,1	10,9 / 30 \pm 1,5
25S	4,5 \pm 2,0	4,0 / 11 \pm 1,9	3,7 / 18 \pm 1,2	3,9 / 13 \pm 1,2	3,8 / 16 \pm 1,9
25R	4,8 \pm 1,5	4,2 / 13 \pm 1,5	3,9 / 19 \pm 1,6	4,1 / 15 \pm 2,6	3,9 / 19 \pm 1,2
26	4,6 \pm 1,7	4,7 / 2 \pm 2,7	4,8 / 4 \pm 2,1	4,8 / 4 \pm 2,5	5,0 / 9 \pm 1,8
27	3,8 \pm 1,9	3,8 / 0 \pm 1,1	4,0 / 5 \pm 1,7	3,8 / 0 \pm 2,2	3,9 / 3 \pm 1,7
28	70,2 \pm 2,2	58,1 / 17 \pm 1,0	44,3 / 37 \pm 1,1	65,4 / 7 \pm 2,2	39,3 / 44 \pm 1,4
29	4,0 \pm 1,4	4,0 / 0 \pm 1,1	4,1 / 3 \pm 1,2	4,2 / 5 \pm 1,8	4,3 / 8 \pm 1,7
30	120,0 \pm 1,9	108,2 / 10 \pm 0,9	35,4 / 71 \pm 1,8	91,2 / 24 \pm 1,6	19,9 / 83 \pm 2,5
31	10,2 \pm 1,4	7,8 / 24 \pm 1,8	5,3 / 48 \pm 1,0	7,6 / 25 \pm 2,8	3,1 / 70 \pm 2,1
32S	34,2 \pm 2,5	28,8 / 16 \pm 1,5	22,3 / 35 \pm 2,2	31,6 / 8 \pm 1,7	11,8 / 65 \pm 1,5
32R	13,9 \pm 1,7	10,0 / 28 \pm 0,7	8,5 / 39 \pm 0,9	10,8 / 22 \pm 1,4	4,5 / 68 \pm 2,0
33	12,8 \pm 1,4	9,1 / 29 \pm 0,8	4,4 / 66 \pm 1,0	8,1 / 37 \pm 1,4	4,2 / 67 \pm 1,0

34	3,8 ± 2,2	3,1 / 18 ± 1,4	2,5 / 34 ± 1,3	2,0 / 47 ± 2,1	1,9 / 50 ± 2,2
35S	15,2 ± 1,0	10,1 / 34 ± 2,0	8,6 / 43 ± 1,8	8,6 / 43 ± 1,5	5,0 / 67 ± 1,2
35R	12,7 ± 1,1	6,9 / 47 ± 0,7	6,1 / 52 ± 0,9	3,8 / 70 ± 2,4	4,0 / 69 ± 1,3
36S	12,6 ± 2,2	6,5 / 48 ± 1,1	5,1 / 60 ± 0,7	4,8 / 62 ± 1,8	3,5 / 72 ± 2,3
36R	6,2 ± 1,8	2,9 / 53 ± 2,1	2,3 / 63 ± 1,0	2,3 / 63 ± 2,1	1,5 / 76 ± 0,9
37S	4,8 ± 1,3	2,2 / 54 ± 1,4	1,7 / 65 ± 2,1	3,3 / 31 ± 0,2	1,3 / 73 ± 1,4
37R	3,2 ± 1,4	1,2 / 63 ± 1,7	1,0 / 69 ± 0,9	1,5 / 53 ± 1,5	0,6 / 81 ± 1,4
38S	4,1 ± 3,1	1,7 / 49 ± 1,2	1,1 / 73 ± 1,6	3,0 / 17 ± 3,1	1,1 / 76 ± 1,4
38R	2,8 ± 0,9	0,9 / 54 ± 1,0	0,6 / 78 ± 1,1	1,1 / 61 ± 1,0	0,5 / 82 ± 1,0

*Média de duplicata, desvio padrão (n=2).

Da mesma forma que os experimentos anteriores houve degradação preferencial de hopanos (**picos 30-38**, *Figuras 66 e 67, Tabela 28*) em relação aos terpanos tricíclicos (**picos 16-18, 20-22 e 25**, *Figuras 66 e 67, Tabela 28*) para ambos os consórcios, levando a um aumento na razão entre eles [**Tabela 44**, *pág. 219*], sendo que a biodegradação foi mais pronunciada quando se utilizou FB como matriz. Os terpanos tricíclicos de C₂₃-C₃₁ foram mais biodegradados neste ensaio do que nos dois primeiros, também com maior preferência pelos epímeros *R*, com taxas variando de 17 a 25 % com Co1 e de 16 a 27 % com Co2 ambos em 60 dias. O 17 α (H),21 β (H)-30-hopano (**pico 30**) também foi mais biodegradado neste ensaio do que nos outros experimentos, apresentando taxas de 71 e 83 % para Co1 e Co2, respectivamente. Os consórcios mantiveram a mesma ordem de preferência para os homohopanos (**picos 32 e 35-38**, *Figuras 66 e 67, Tabela 28*), porém com maior taxa de biodegradação do que no primeiro e segundo ensaios: C₃₅*R* > C₃₅*S* > C₃₄*R* > C₃₄*S* > C₃₃*R* > C₃₃*S* > C₃₂*R* > C₃₂*S* > C₃₁*R* > C₃₁*S*.

Para a série dos norhopanos houve aumento da concentração de 3 a 24 % para o Co1 e de 17 a 28 % quando o Co2 foi utilizado, novamente com concomitante degradação de hopanos, resultando mais uma vez no aumento da razão de 25-NH

[Tabela 44, pág. 219]. Estes dados podem ser visualizados pelos cromatogramas mostrados nas Figuras 68 e 69 e pelo aumento da concentração como mostra a Tabela 29.

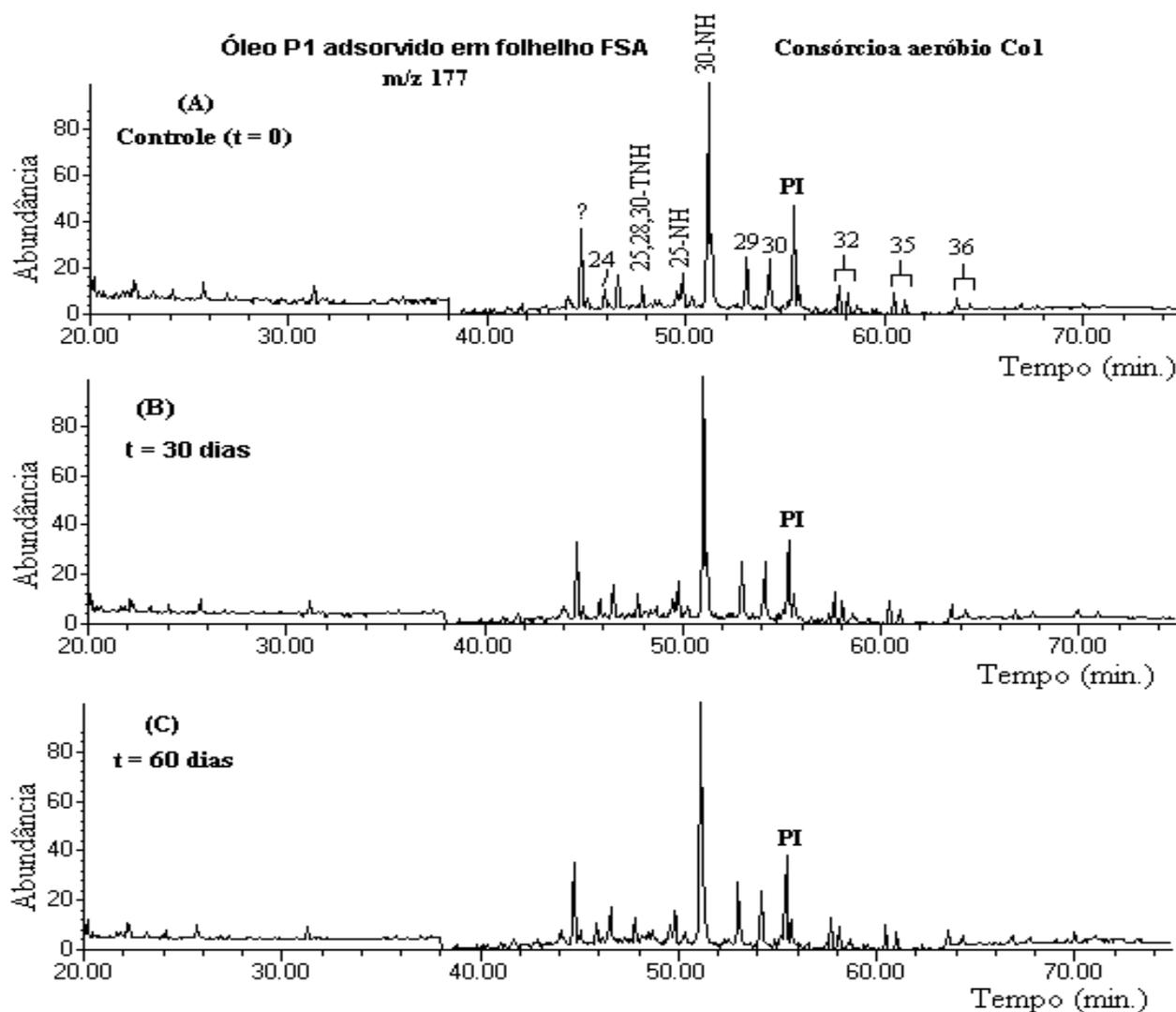


Figura 68. SIM m/z 177 para P1 adsorvido em folhelho FSA com Co1 em (B) 30 e (C) 60 dias. 25,28,30-TNH = $17\alpha(H),18\alpha(H),21\beta(H)$ -25,28,30-trisnorhopano; 25-NH = $17\alpha(H),21\beta(H)$ -25-norhopano; 30-NH = $17\alpha(H),21\beta(H)$ -30-norhopano; PI = Padrão Interno (5α -coleston-3-ona).

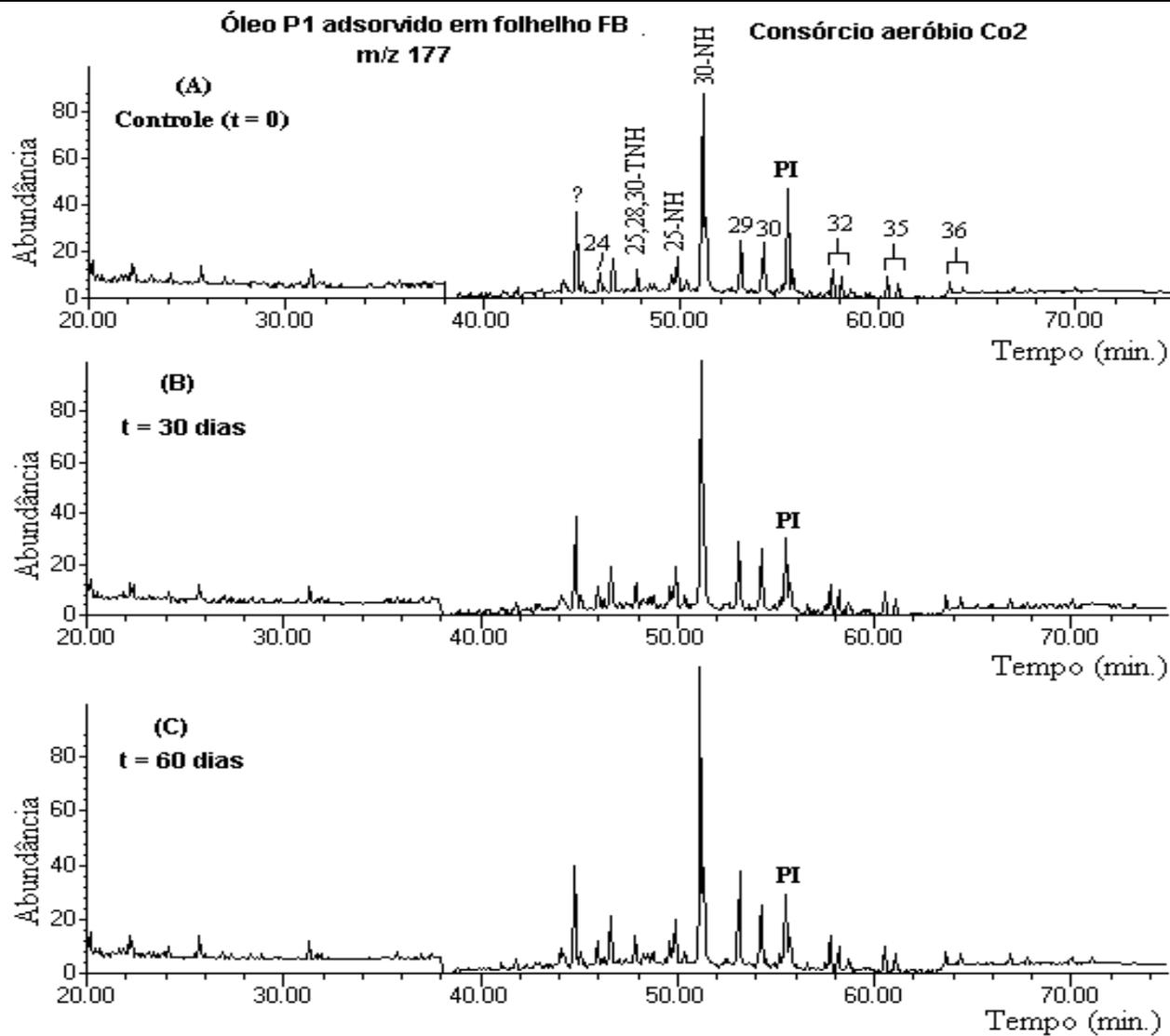


Figura 69. SIM m/z 177 para P1 adsorvido em folhelho FB com Co₂ em **(B)** 30 e **(C)** 60 dias. 25,28,30-TNH = 17 α (H),18 α (H),21 β (H)-25,28,30-trisnorhopano; 25-NH = 17 α (H),21 β (H)-25-norhopano; 30-NH = 17 α (H),21 β (H)-30-norhopano; PI = Padrão Interno (5 α -colestano-3-ona).

Tabela 29. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1), mostrando enriquecimento, para a série de norhopanos detectados através do SIM m/z 191 e 177 com P1 adsorvido em folhelhos FSA e FB para Co1 e Co2

Pico	Compostos	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) (controle, $t = 0$)	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) ($t = 60$ dias)	
			FSA/Co1	FB/Co2
- ^a	17 α (H),18 α (H),21 β (H)- 25,28,30-trisnorhopano	3,7 \pm 2,3	3,8 \pm 1,2	4,6 \pm 1,4
26 ^b	17 α (H),18 α (H),21 β (H)- 28,30-bisnorhopano	4,6 \pm 1,7	4,8 \pm 1,9	5,4 \pm 1,5
27 ^c	17 α (H),21 β (H)-25-norhopano	3,8 \pm 1,9	4,2 \pm 1,4	5,1 \pm 1,0
28 ^d	17 α (H),21 β (H)-30-norhopano	70,2 \pm 2,2	87,3 \pm 0,9	90,2 \pm 1,6
29 ^e	17 β (H),21 α (H)-normoretano	4,0 \pm 1,4	4,2 \pm 0,8	4,9 \pm 1,1

^a17 α (H),18 α (H),21 β (H)-25,28,30-trisnorhopano em m/z 177 (Figuras 45 e 46); ^b17 α (H),18 α (H),21 β (H)-28,30-bisnorhopano em m/z 191 (Figuras 38 e 39); ^c17 α (H),21 β (H)-25-norhopano em m/z 191 e 177; ^d17 α (H),21 β (H)-30-norhopano em m/z 191 e 177; ^e17 β (H),21 α (H)-normoretano em m/z 191 e 177.

3.2.1.3.4 Esteranos Regulares

Os cromatogramas obtidos através da técnica SIM m/z 217 para o Co1 e Co2 com P1 adsorvido nos folhelhos FSA e FB, respectivamente estão representados nas **Figuras 70 e 71**.

A **Tabela 30** mostra as concentrações em $\mu\text{g/g}$ F1 e as taxas de biodegradação calculadas para este experimento com ambos os consórcios.

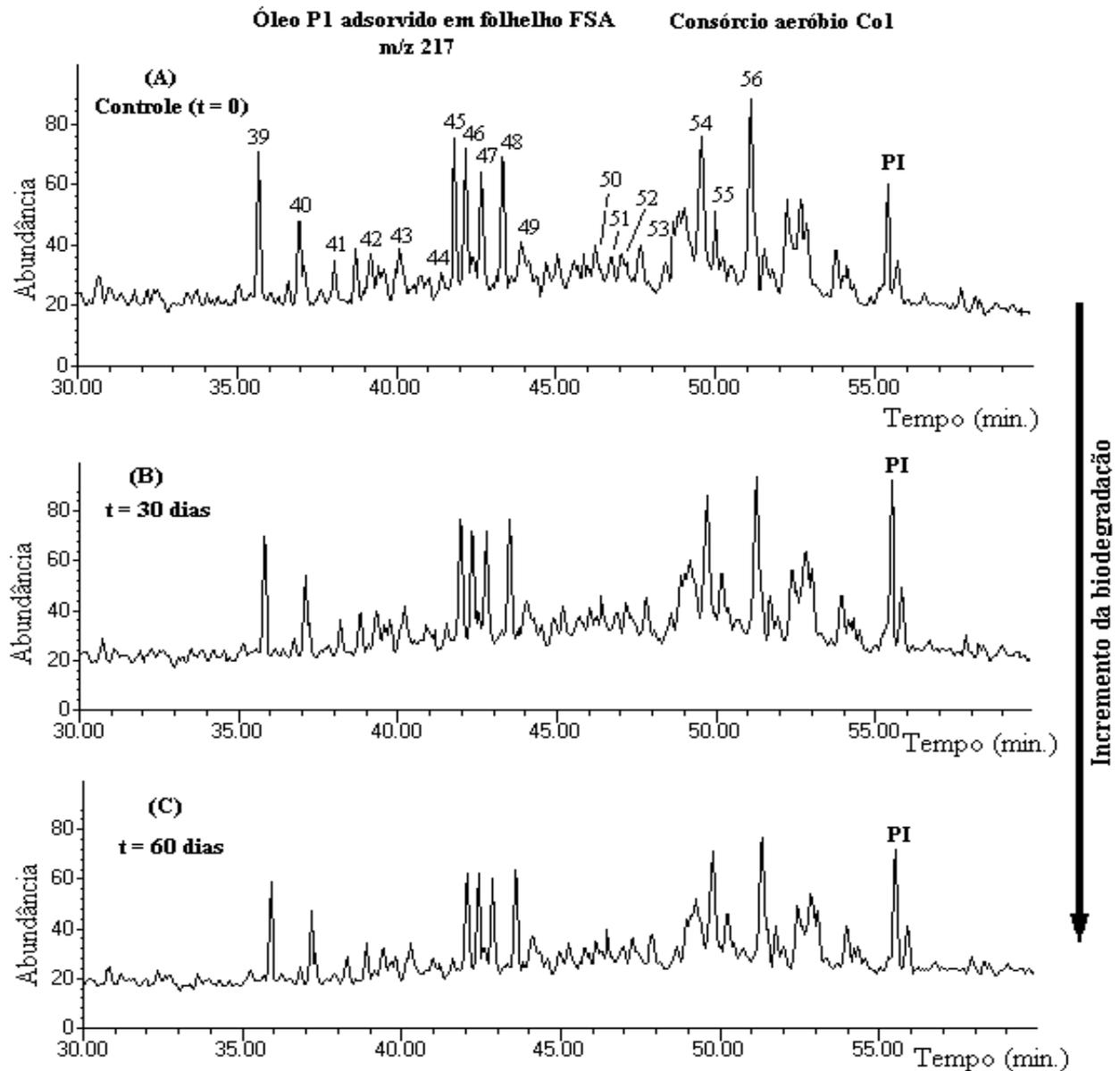


Figura 70. SIM m/z 217 para P1 adsorvido em folhelho FSA mostrando o incremento da biodegradação de esteranos normais e diasteranos com Co1 em **(B)** 30 e **(C)** 60 dias. PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

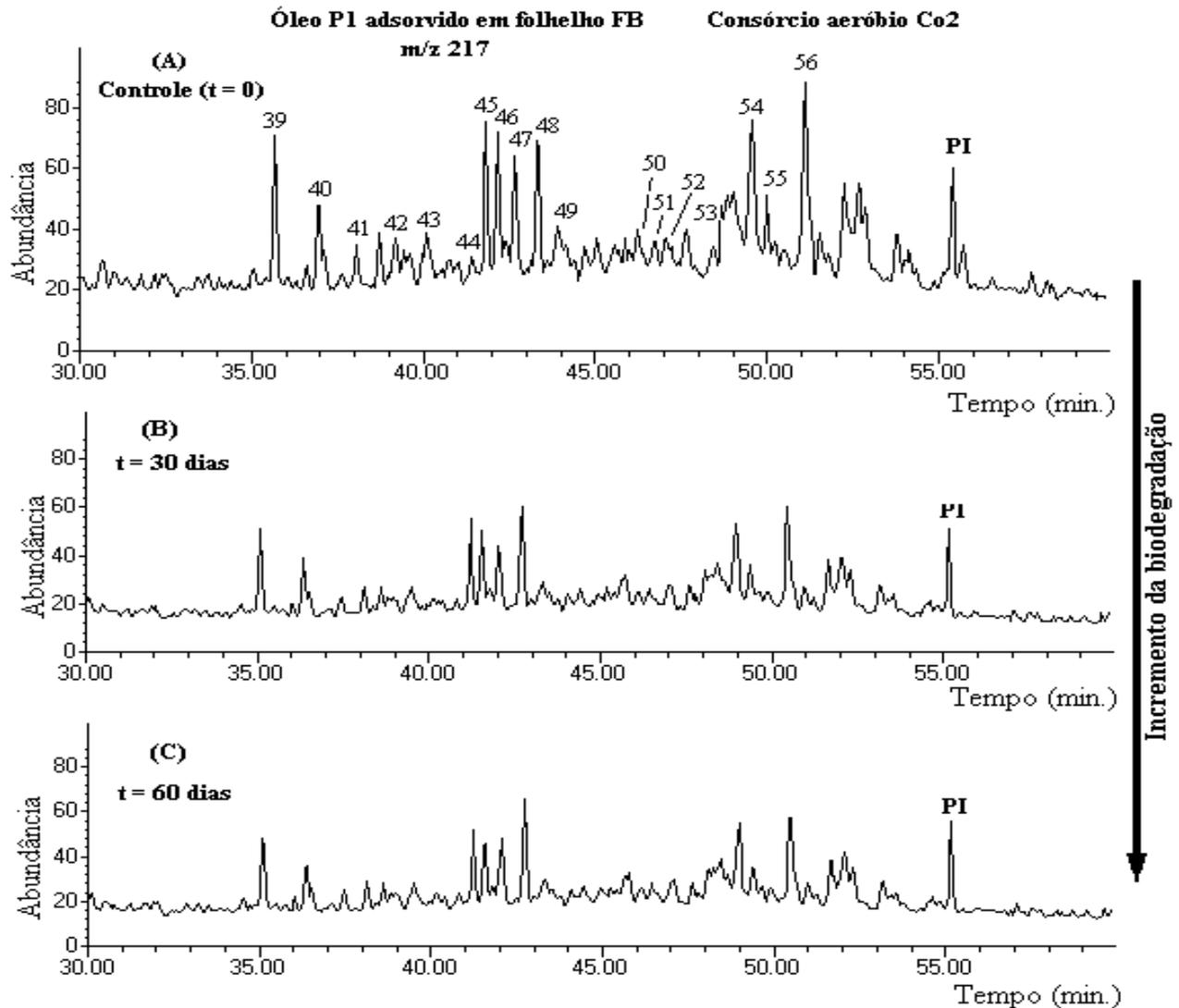


Figura 71. SIM m/z 217 para P1 adsorvido em folhelho FB mostrando o incremento da biodegradação de esteranos normais e diasteranos com Co_2 em **(B)** 30 e **(C)** 60 dias. PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

Tabela 30. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para esteranos em m/z 217 com P1 adsorvido em folhelhos FSA e FB para Co1 e Co2

Pico	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%)*				
	Controle	Tempo (dias)			
		0	FSA/Co1		FB/Co2
		30	60	30	60
39	36,4 \pm 1,0	27,1 / 26 \pm 2,8	22,3 / 39 \pm 3,0	24,2 / 35 \pm 3,2	22,1 / 39 \pm 1,9
40	13,8 \pm 2,7	9,2 / 33 \pm 1,0	8,1 / 41 \pm 2,01	9,4 / 32 \pm 2,5	7,8 / 43 \pm 2,6
41	5,8 \pm 3,0	3,8 / 34 \pm 1,9	3,2 / 45 \pm 1,2	3,7 / 36 \pm 1,4	3,1 / 47 \pm 3,8
42	4,9 \pm 3,2	3,2 / 35 \pm 2,1	2,8 / 43 \pm 2,1	3,1 / 37 \pm 1,1	2,7 / 45 \pm 3,2
43	4,6 \pm 0,8	3,8 / 17 \pm 2,8	2,9 / 37 \pm 1,9	3,5 / 24 \pm 2,6	2,8 / 39 \pm 1,2
44	2,5 \pm 2,5	2,2 / 12 \pm 0,9	1,7 / 32 \pm 1,7	2,0 / 20 \pm 1,5	1,6 / 36 \pm 1,8
45	34,2 \pm 2,6	17,3 / 49 \pm 2,0	11,6 / 66 \pm 1,4	15,4 / 55 \pm 3,2	11,1 / 68 \pm 1,7
46	35,1 \pm 2,1	16,5 / 53 \pm 2,4	11,6 / 67 \pm 1,2	15,2 / 57 \pm 1,0	10,3 / 71 \pm 1,6
47	22,1 \pm 2,4	13,5 / 39 \pm 2,5	7,3 / 67 \pm 1,5	11,5 / 48 \pm 1,7	6,4 / 71 \pm 3,1
48	24,6 \pm 2,4	13,3 / 46 \pm 2,2	7,4 / 70 \pm 0,9	10,6 / 57 \pm 1,0	5,2 / 79 \pm 2,5
49	4,5 \pm 1,6	4,1 / 9 \pm 1,3	3,2 / 29 \pm 2,2	3,9 / 13 \pm 1,4	3,0 / 33 \pm 2,1
50	3,3 \pm 2,7	2,4 / 27 \pm 1,5	1,4 / 52 \pm 0,9	2,6 / 21 \pm 1,8	1,2 / 64 \pm 1,5
51	2,1 \pm 1,5	1,3 / 38 \pm 2,1	0,9 / 57 \pm 1,1	0,9 / 57 \pm 1,5	0,7 / 67 \pm 1,7
52	2,4 \pm 2,0	1,4 / 42 \pm 1,6	1,1 / 54 \pm 0,8	1,4 / 42 \pm 1,6	0,8 / 67 \pm 3,2
53	3,6 \pm 1,7	2,0 / 44 \pm 1,3	1,4 / 61 \pm 1,2	2,3 / 36 \pm 1,2	1,2 / 67 \pm 2,5
54	33,8 \pm 1,9	20,2 / 40 \pm 3,7	18,0 / 47 \pm 1,9	19,4 / 43 \pm 2,4	17,5 / 48 \pm 3,0
55	4,0 \pm 2,2	3,2 / 20 \pm 1,8	2,0 / 50 \pm 1,4	3,0 / 25 \pm 1,8	2,1 / 48 \pm 3,1
56	36,1 \pm 1,0	27,5 / 24 \pm 3,1	17,8 / 51 \pm 1,2	25,1 / 30 \pm 1,5	18,0 / 50 \pm 2,0

*Média de duplicata, desvio padrão (n=2).

Os esteranos normais e diasteranos foram biodegradados na mesma ordem já relatada nos ensaios anteriores: $\alpha\alpha\alpha$ 20R \gg $\alpha\beta\beta$ 20R + $\alpha\beta\beta$ 20S \geq $\alpha\alpha\alpha$ 20S \gg diasteranos, com degradação seletiva de $C_{27} > C_{28} > C_{29}$ [Tabela 30] para ambos os

consórcios, mostrando que a preferência de degradação para esteranos é independente se o petróleo está adsorvido ou não.

Neste experimento também houve remoção preferencial de hopanos (**picos 30-38**, *Figuras 66 e 67, Tabela 28*) (com enriquecimento de 25-norhopanos) antes dos esteranos (**picos 45-56**, *Figuras 70 e 71, Tabela 30*), levando a um aumento da razão esterano/hopano para ambos os consórcios aeróbios [**Tabela 44**, *pág. 219*].

A análise de todos os experimentos com o consórcio aeróbio revelou que a dispersão do petróleo em areia e/ou folhelhos não altera significativamente a microbiota, uma vez que as bactérias pertencentes aos gêneros *Achromobacter* e *Bacillus* são predominantes em todos os consórcios aeróbios. Porém pode inibir e/ou aumentar a expressão de outras enzimas presentes nos microrganismos, e com isso, provocar aumento e/ou diminuição na velocidade do processo, bem como na seletividade de degradação para algumas classes de biomarcadores. Isto pode ser atribuído a um aumento da superfície de contato óleo-água tornando os compostos do petróleo mais acessíveis à ação dos microrganismos e a presença de microconstituintes [**Tabela 25**] e nutrientes inorgânicos, tais como Fe, P e Si, presentes nas matrizes, que favorece o aumento da biomassa e conseqüente aumento das taxas de biodegradação do petróleo.

É possível também verificar que nas condições aeróbias aqui estudadas, independente se o petróleo está adsorvido ou não, a suscetibilidade de biodegradação para as classes de biomarcadores analisadas segue a ordem: hidrocarbonetos > hopanos e homohopanos (com enriquecimento de 25-norhopanos) > esteranos > terpanos tricíclicos. Sendo que para os homohopanos houve preferência pelos homólogos de maior peso molecular $C_{35} > C_{34} > C_{33} > C_{32} > C_{31}$ e a biodegradação dos esteranos seguiu a ordem $\alpha\alpha\alpha\ 20R \gg \alpha\beta\beta\ 20R + \alpha\beta\beta\ 20S \geq \alpha\alpha\alpha\ 20S \gg$ diasteranos, diminuindo com o número de carbonos [$C_{27} > C_{28} > C_{29}$].

3.2.2 BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA (AN)

Neste item são abordados os resultados obtidos quando se utilizou o consórcio anaeróbio (AN) com P1 disperso no meio, adsorvido em areia e nos folhelhos FSA e FB. Aqui é feita uma comparação com os dados que foram discutidos quando as condições de aerobiose foram usadas.

Os microrganismos responsáveis pelo processo de biodegradação anaeróbia foram identificados como sendo anaeróbios facultativos e pertencem aos gêneros *Bacillus* (89 %) e *Acinetobacter* (11 %), ambos conhecidos pela capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono diretamente (Toledo *et al.*, 2006) ou por utilizarem os metabólitos produzidos por outras bactérias, quando estão em consórcios (DuTeau *et al.*, 1998).

3.2.2.1 Análise da fração neutra saturada com petróleo disperso no meio

3.2.2.1.1 *n*-alcanos e isoprenóides

Os RICs *m/z* 71 mostrando o incremento da biodegradação de 30 a 180 dias para o consórcio anaeróbio AN está representado na **Figura 72** e as taxas de biodegradação para este ensaio estão na **Tabela 31**.

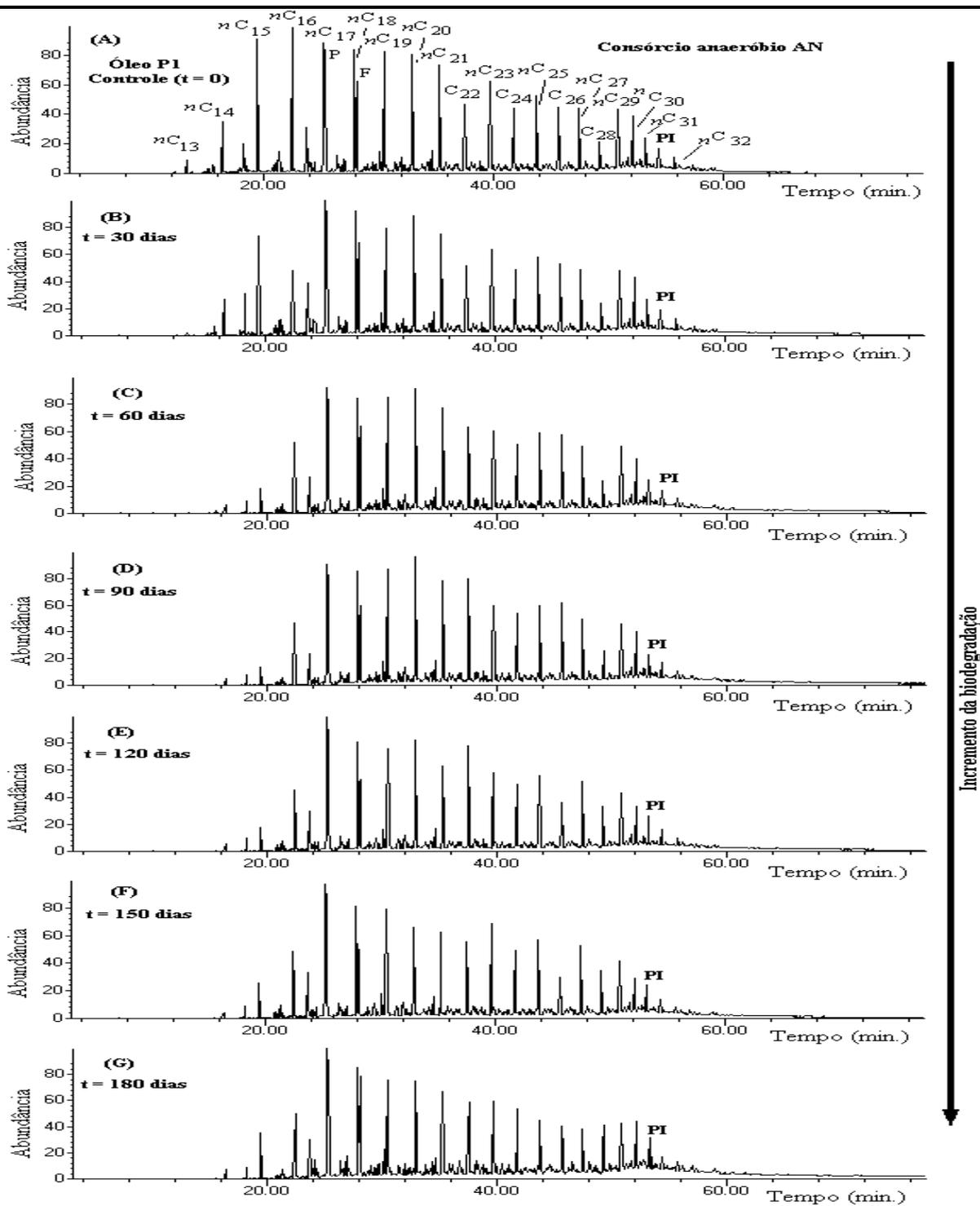


Figura 72. RIC m/z 71 mostrando a biodegradação de PI disperso no meio com consórcio anaeróbio AN durante 180 dias de incubação. nC_{13} - nC_{32} = n -alcanos; P = Pristano; F = Fitano; PI = Padrão Interno (5 α -colestano-3-ona).

Tabela 31. Taxas de biodegradação (%) para *n*-alcanos e isoprenóides utilizando P1 disperso no meio com consórcio anaeróbico

Pico	Composto	Fórmula	MM ^a	Taxas de biodegradação (%) ^b /Tempo (dias)					
				30	60	90	120	150	180
<i>n</i> C ₁₃	<i>n</i> -Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	184	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₄	<i>n</i> -Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀	198	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₅	<i>n</i> -Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	212	5 ± 1,0	11 ± 1,1	13 ± 1,0	36 ± 2,8	64 ± 1,3	68 ± 1,5
<i>n</i> C ₁₆	<i>n</i> -Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	226	28 ± 0	28 ± 1,3	42 ± 1,3	50 ± 3,2	62 ± 4,0	63 ± 1,3
<i>n</i> C ₁₇	<i>n</i> -Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	240	5 ± 1,2	6 ± 0,4	15 ± 0,5	18 ± 1,0	42 ± 2,1	50 ± 0,9
P	Pristano	C ₁₉ H ₄₀	268	3 ± 0,2	5 ± 2,2	13 ± 3,0	16 ± 0,4	31 ± 1,2	45 ± 0,5
<i>n</i> C ₁₈	<i>n</i> -Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	254	2 ± 0,6	9 ± 1,5	18 ± 1,9	24 ± 0,9	48 ± 1,1	54 ± 2,1
F	Fitano	C ₂₀ H ₄₂	282	2 ± 0	4 ± 0,6	13 ± 1,6	14 ± 0,8	30 ± 0,5	39 ± 1,2
<i>n</i> C ₁₉	<i>n</i> -Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	268	18 ± 1,7	34 ± 1,6	40 ± 1,4	50 ± 1,2	53 ± 1,2	55 ± 0,6
<i>n</i> C ₂₀	<i>n</i> -Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	282	18 ± 1,0	16 ± 0,2	16 ± 0,9	15 ± 3,0	32 ± 1,2	45 ± 2,2
<i>n</i> C ₂₁	<i>n</i> -Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	296	1 ± 2,2	34 ± 0,6	36 ± 2,1	56 ± 0,9	61 ± 1,5	69 ± 1,5
<i>n</i> C ₂₂	<i>n</i> -Docosano	C ₂₂ H ₄₆	310	22 ± 2,0	20 ± 2,6	18 ± 1,5	18 ± 1,1	34 ± 1,6	49 ± 0,9
<i>n</i> C ₂₃	<i>n</i> -Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	324	23 ± 2,0	31 ± 1,2	42 ± 1,4	46 ± 2,2	56 ± 1,1	60 ± 0,8
<i>n</i> C ₂₄	<i>n</i> -Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	338	27 ± 1,1	38 ± 0,6	41 ± 1,1	48 ± 1,4	58 ± 1,0	65 ± 1,3
<i>n</i> C ₂₅	<i>n</i> -Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	352	25 ± 2,1	31 ± 0,4	41 ± 2,9	45 ± 0,6	53 ± 0,8	60 ± 1,8
<i>n</i> C ₂₆	<i>n</i> -Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	366	29 ± 1,8	37 ± 1,8	38 ± 0,5	39 ± 1,4	47 ± 1,4	64 ± 0,6
<i>n</i> C ₂₇	<i>n</i> -Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	380	29 ± 0	31 ± 1,6	39 ± 1,4	43 ± 0,8	47 ± 1,7	68 ± 1,6
<i>n</i> C ₂₈	<i>n</i> -Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	394	24 ± 1,6	31 ± 0,5	36 ± 2,2	38 ± 0,9	49 ± 1,5	63 ± 1,0
<i>n</i> C ₂₉	<i>n</i> -Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	408	26 ± 0,9	28 ± 0,4	38 ± 1,3	47 ± 1,1	66 ± 1,8	69 ± 2,0
<i>n</i> C ₃₀	<i>n</i> -Triacontano	C ₃₀ H ₆₂	422	25 ± 1,9	28 ± 1,0	30 ± 1,4	31 ± 1,0	33 ± 1,3	44 ± 1,1
<i>n</i> C ₃₁	<i>n</i> -Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	436	23 ± 1,4	25 ± 1,4	33 ± 1,2	36 ± 0,6	47 ± 2,1	49 ± 1,6
<i>n</i> C ₃₂	<i>n</i> -Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆	450	15 ± 2,3	21 ± 1,2	23 ± 1,3	35 ± 1,0	41 ± 2,0	50 ± 1,1

^aMM = Massa Molecular; ^bMédia de duplicata, desvio padrão (n=2).

O consórcio anaeróbio com o petróleo disperso no meio degradou seletivamente *n*-alcanos e isoprenóides com uma menor taxa de biodegradação (intervalos de tempos maiores), quando comparada aos aeróbios. Mesmo após 180 dias de ensaio observou-se que a série homóloga de *n*-alcanos e os isoprenóides P e F foram apenas levemente biodegradados, com taxas variando de 39 a 69 %.

De forma semelhante aos aeróbios, este consórcio também biodegrada *n*-alcanos antes dos isoprenóides, resultando no aumento das razões P/*n*C₁₇ e F/*n*C₁₈ e na diminuição da razão P/F [Tabela 43, *pág.213*], evidenciando que a preferência em degradar *n*-alcanos à compostos ramificados independe das condições, se aeróbias ou anaeróbias, utilizadas no experimento.

Contrário ao que ocorreu para os aeróbios, o IPC apresentou valores > 1 com o aumento da biodegradação, sugerindo que os consórcios anaeróbios degradam **preferencialmente *n*-alcanos com número ímpar de carbonos em comparação aos alcanos com número par de carbono** [Tabela 43].

3.2.2.1.2 Sesquiterpanos Bicíclicos

O consórcio anaeróbio degradou os sesquiterpanos bicíclicos com esqueleto tipo drimano e homodrimano de forma semelhante ao consórcio aeróbio Co2 com P1 adsorvido em areia.

A **Figura 73** mostra o RIC *m/z* 123 para este experimento.

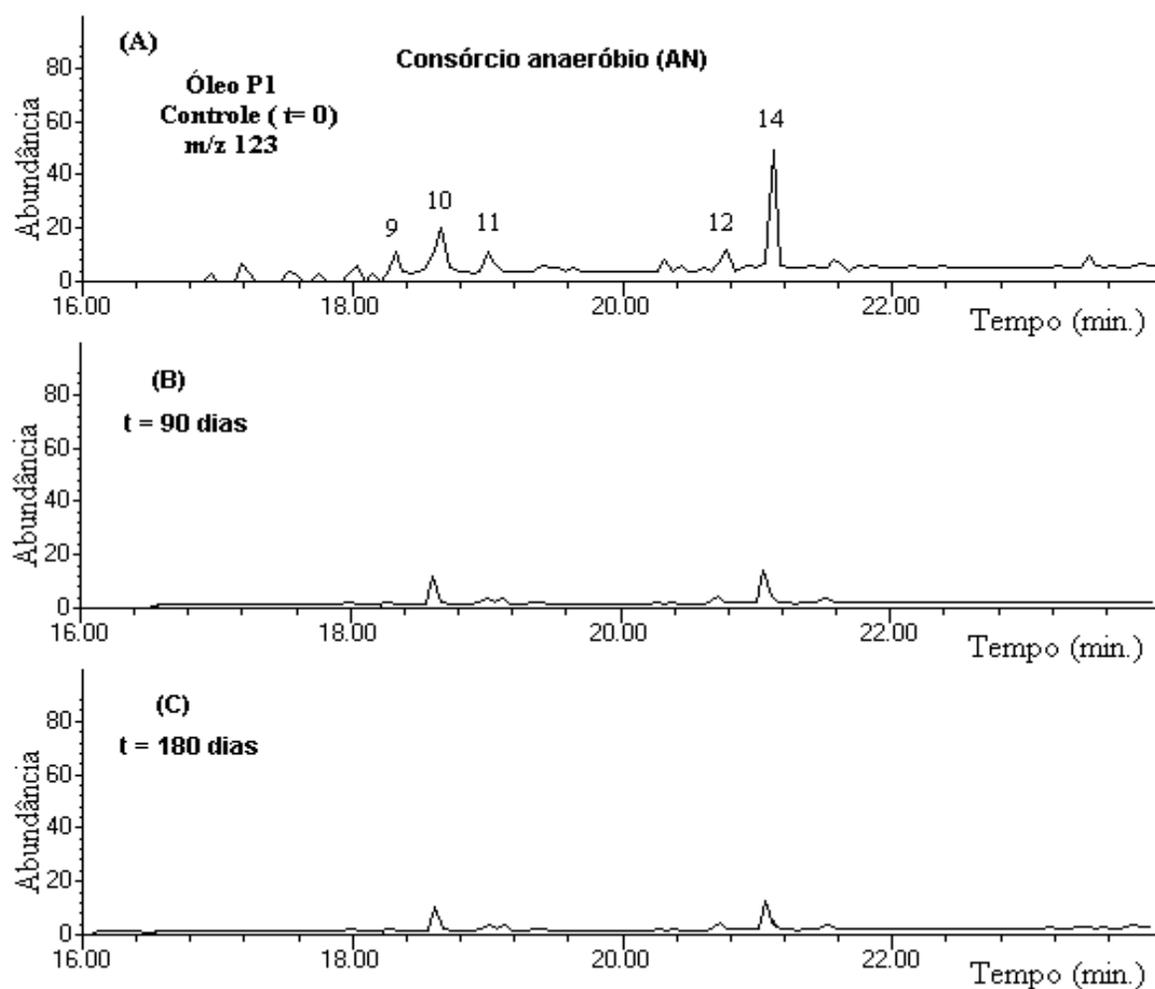


Figura 73. Sesquiterpanos bicíclicos monitorados através do íon m/z 123 no ensaio com P1 disperso no meio com consórcio anaeróbio em (B) 90 e (C) 180 dias.

3.2.2.1.3 Terpanos Tricíclicos, Tetracíclicos e Pentacíclicos

A **Figura 74** apresenta o cromatograma obtido para os terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos através do SIM m/z 191 com consórcio anaeróbio e P1 disperso no meio.

A **Tabela 32** mostra a concentração em $\mu\text{g/g}$ F1 e as taxas de biodegradação calculadas para este ensaio em 90 e 180 dias.

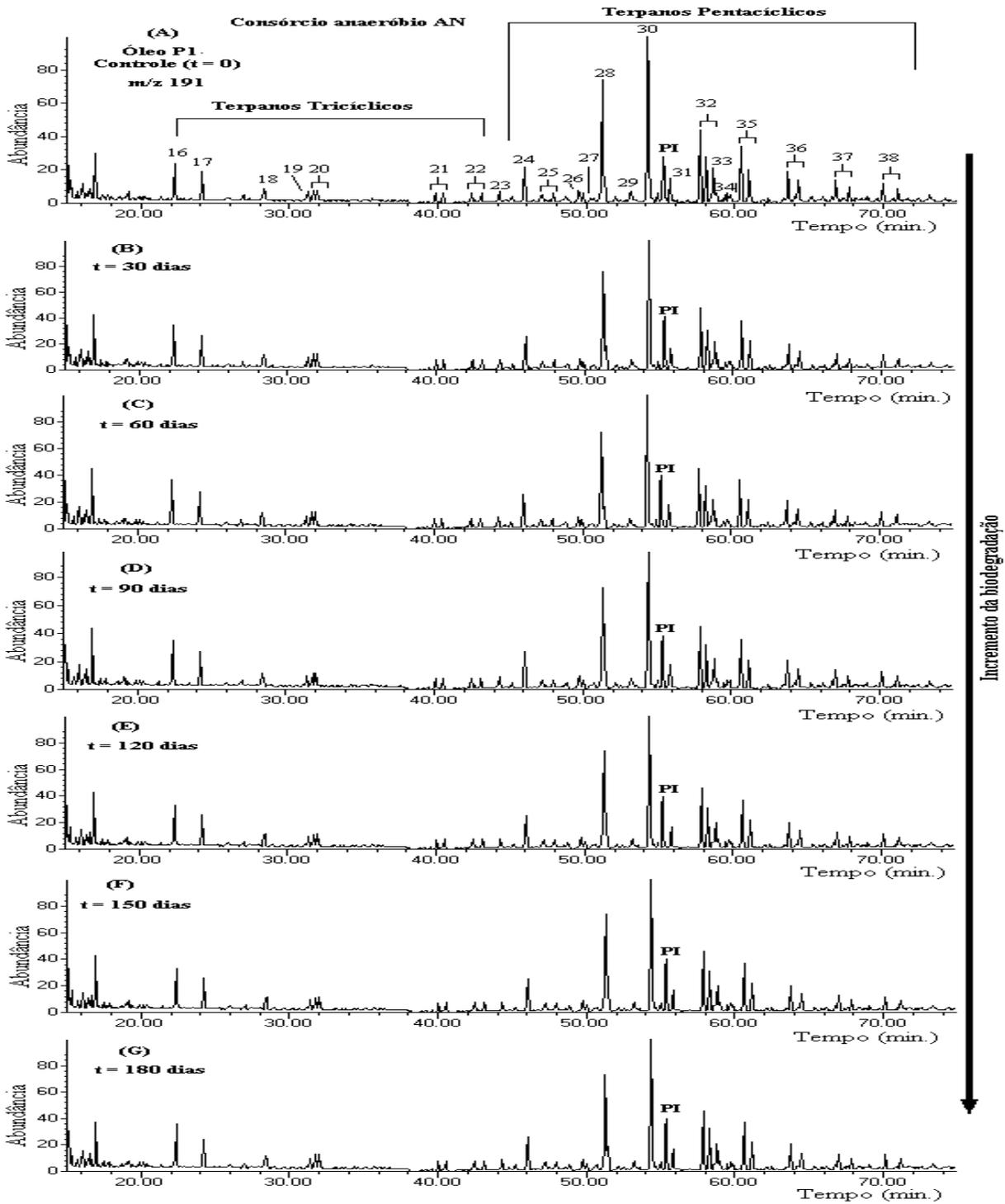


Figura 74. RIC m/z 191 para o consórcio anaeróbio com P1 disperso no meio. PI = Padrão Interno (5α -colestan-3-ona).

Tabela 32. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos em m/z 191 com consórcio anaeróbico e P1 disperso no meio

Pico	Concentração / TB (%)*						
	Tempo (dias)						
	0	30	60	90	120	150	180
16	33,0 \pm 3,0	28,2 / 15 \pm 1,0	28,0 / 15 \pm 3,2	28,1 / 15 \pm 2,5	27,7 / 16 \pm 2,6	26,8 / 19 \pm 1,1	21,7 / 34 \pm 1,8
17	16,5 \pm 1,0	15,6 / 5 \pm 3,0	15,2 / 8 \pm 1,2	13,6 / 18 \pm 2,7	12,5 / 24 \pm 3,2	11,7 / 29 \pm 2,4	11,2 / 32 \pm 3,4
18	5,9 \pm 2,7	5,8 / 2 \pm 3,8	5,6 / 5 \pm 1,9	5,4 / 8 \pm 1,9	5,4 / 8 \pm 1,0	5,2 / 12 \pm 2,9	4,8 / 19 \pm 1,5
19	4,8 \pm 3,8	4,6 / 4 \pm 2,7	4,6 / 4 \pm 2,0	4,5 / 6 \pm 3,6	4,4 / 8 \pm 1,1	4,3 / 10 \pm 1,4	3,8 / 21 \pm 1,4
20S	6,0 \pm 3,2	5,9 / 3 \pm 3,2	5,8 / 5 \pm 2,4	5,8 / 5 \pm 1,7	5,5 / 10 \pm 1,8	5,2 / 15 \pm 3,1	4,0 / 34 \pm 3,8
20R	6,1 \pm 0,8	5,5 / 8 \pm 0,8	5,3 / 12 \pm 2,7	5,2 / 13 \pm 2,6	4,4 / 27 \pm 2,0	4,2 / 30 \pm 1,9	3,6 / 40 \pm 2,0
21S	5,3 \pm 2,1	5,6 / 5 \pm 2,1	5,4 / 8 \pm 1,4	4,9 / 17 \pm 1,5	4,0 / 32 \pm 1,6	3,8 / 36 \pm 1,5	3,6 / 39 \pm 2,3
21R	5,9 \pm 2,6	4,6 / 13 \pm 2,6	4,3 / 19 \pm 1,2	4,0 / 25 \pm 2,5	3,8 / 28 \pm 3,1	3,4 / 36 \pm 2,3	3,2 / 40 \pm 3,1
22S	4,9 \pm 2,4	4,7 / 10 \pm 2,6	4,4 / 15 \pm 1,4	4,2 / 19 \pm 1,0	4,2 / 19 \pm 1,7	4,0 / 23 \pm 2,4	3,1 / 37 \pm 1,2
22R	5,2 \pm 2,4	4,8 / 2 \pm 2,3	4,6 / 6 \pm 2,0	4,2 / 14 \pm 2,2	3,9 / 20 \pm 1,4	3,4 / 31 \pm 2,4	3,2 / 38 \pm 1,7
23	5,4 \pm 1,6	5,2 / 4 \pm 1,4	5,2 / 4 \pm 3,8	5,1 / 6 \pm 1,0	4,8 / 11 \pm 2,5	4,2 / 22 \pm 1,7	3,9 / 28 \pm 1,6
24	15,6 \pm 2,7	15,2 / 3 \pm 1,2	14,8 / 5 \pm 0,9	14,6 / 6 \pm 1,8	13,8 / 12 \pm 1,4	11,5 / 26 \pm 2,7	9,4 / 40 \pm 1,9
25S	4,5 \pm 2,0	4,6 / 4 \pm 2,2	4,5 / 6 \pm 3,1	4,4 / 8 \pm 1,5	3,9 / 19 \pm 1,9	3,9 / 19 \pm 1,7	3,4 / 29 \pm 2,3
25R	4,8 \pm 1,5	4,4 / 2 \pm 1,7	4,3 / 4 \pm 1,4	4,2 / 7 \pm 1,7	3,6 / 20 \pm 2,2	3,2 / 29 \pm 1,8	3,0 / 33 \pm 2,0
26	4,6 \pm 1,7	4,6 / 0 \pm 1,4	4,6 / 0 \pm 2,2	4,4 / 4 \pm 3,1	4,2 / 9 \pm 2,5	3,7 / 20 \pm 1,7	3,4 / 26 \pm 3,8
27	3,8 \pm 1,9	3,8 / 0 \pm 3,8	3,6 / 5 \pm 1,9	3,4 / 11 \pm 2,2	3,4 / 11 \pm 3,1	3,1 / 18 \pm 1,9	2,8 / 26 \pm 1,7
28	70,2 \pm 2,2	68,6 / 2 \pm 1,9	66,8 / 5 \pm 1,4	65,8 / 6 \pm 2,2	55,2 / 21 \pm 1,4	47,3 / 33 \pm 1,9	40,2 / 43 \pm 1,4

29	4,0 ± 1,4	3,9 / 3 ± 2,7	3,9 / 3 ± 2,0	3,8 / 5 ± 1,9	3,6 / 10 ± 1,7	3,2 / 20 ± 1,7	2,9 / 28 ± 1,7
30	120,0 ± 1,9	118,0 / 2 ± 1,5	116,0 / 3 ± 2,2	111,2 / 7 ± 1,9	89,0 / 26 ± 2,0	54,7 / 54 ± 1,4	48,9 / 59 ± 2,5
31	10,2 ± 1,4	10,0 / 2 ± 1,7	9,6 / 6 ± 3,1	8,4 / 18 ± 3,8	6,3 / 38 ± 1,9	5,2 / 49 ± 3,8	4,8 / 53 ± 2,7
32S	34,2 ± 2,5	33,0 / 4 ± 2,7	32,0 / 6 ± 1,4	32,0 / 6 ± 1,7	31,6 / 8 ± 1,7	29,4 / 14 ± 0,9	18,2 / 47 ± 1,5
32R	13,9 ± 1,7	12,6 / 9 ± 1,9	12,1 / 13 ± 1,9	11,8 / 15 ± 1,4	11,4 / 18 ± 2,2	10,6 / 24 ± 1,5	6,8 / 51 ± 2,0
33	12,8 ± 1,4	11,7 / 9 ± 2,0	10,1 / 21 ± 2,6	9,4 / 27 ± 1,4	8,5 / 34 ± 1,7	8,2 / 36 ± 2,2	7,6 / 41 ± 4,0
34	3,8 ± 2,2	3,6 / 5 ± 0,2	3,4 / 11 ± 1,5	2,9 / 24 ± 3,1	2,6 / 32 ± 0,9	1,9 / 50 ± 2,0	1,8 / 53 ± 1,5
35S	15,2 ± 1,0	14,4 / 5 ± 3,2	13,9 / 9 ± 2,0	13,6 / 11 ± 2,5	12,8 / 16 ± 0,9	11,2 / 26 ± 0,9	8,8 / 42 ± 2,2
35R	12,7 ± 1,1	8,7 / 31 ± 1,2	8,4 / 34 ± 0,8	7,2 / 43 ± 2,4	6,9 / 46 ± 3,4	6,7 / 47 ± 0,8	6,4 / 50 ± 1,3
36S	12,6 ± 2,2	10,2 / 19 ± 2,4	9,1 / 28 ± 2,3	8,2 / 35 ± 1,8	7,8 / 38 ± 1,6	7,4 / 41 ± 5,0	7,4 / 41 ± 4,3
36R	6,2 ± 1,8	5,0 / 19 ± 1,0	5,0 / 19 ± 2,1	4,8 / 23 ± 6,1	3,6 / 42 ± 0,1	3,2 / 48 ± 2,2	3,2 / 48 ± 3,1
37S	4,8 ± 1,3	4,6 / 4 ± 2,2	4,6 / 4 ± 1,8	4,2 / 13 ± 0,2	3,7 / 23 ± 2,1	3,4 / 29 ± 1,1	2,9 / 40 ± 1,4
37R	3,2 ± 1,4	3,1 / 3 ± 1,1	3,0 / 6 ± 2,0	2,7 / 16 ± 1,5	2,4 / 25 ± 1,4	1,9 / 41 ± 3,1	1,8 / 44 ± 1,5
38S	4,1 ± 3,1	4,0 / 2 ± 3,2	3,9 / 5 ± 0,4	3,8 / 7 ± 4,1	3,4 / 17 ± 3,1	2,6 / 37 ± 1,8	2,6 / 36 ± 1,5
38R	2,8 ± 0,9	2,7 / 4 ± 0,9	2,6 / 7 ± 0,9	2,4 / 14 ± 1,0	2,1 / 25 ± 1,3	2,0 / 29 ± 2,4	1,7 / 39 ± 1,5

*Média de duplicata, desvio padrão (n=2).

O consórcio anaeróbio apresentou um comportamento contrário aos aeróbios na biodegradação de terpanos tricíclicos e pentacíclicos. Observou-se uma leve preferência pelos terpanos tricíclicos C_{28} e C_{29} (**pico 21 e 22**, *Figura 74*, *Tabela 32*) em relação ao hopano C_{35} (**pico 38**, *Figura 74*, *Tabela 32*) levando a uma diminuição das razões TT [(C_{28} terpano tricíclico (TT)/ C_{35} 17 α ,21 β -homohopano ($C_{35}H$), C_{29} terpano tricíclico (TT)/ C_{35} 17 α ,21 β -homohopano ($C_{35}H$)] [**Tabela 44**, *pág. 219*]. Nos ensaios com aeróbios estas razões aumentaram mostrando remoção preferencial do hopano C_{35} .

Mesmo sendo mais resistentes ao processo de biodegradação do que *n*-alcanos e, algumas vezes, de hopanos, a remoção dos terpanos tricíclicos de C_{23} - C_{31} pode ser avaliada e, neste estudo, comparativamente eles foram mais biodegradados pelos microrganismos anaeróbios do que pelos aeróbios apresentando taxas de degradação variando de 19 a 40 %.

Os epímeros 22*R* de C_{31} - C_{35} homohopanos de menor peso molecular [$C_{31} > C_{32} > C_{33} > C_{34} > C_{35}$] foram preferencialmente biodegradados pelos anaeróbios, contrário aos aeróbios que mostraram remoção preferencial dos homólogos de maior peso molecular. O índice de homohopano [IH, **Tabela 44**] também confirma a remoção preferencial de C_{31} - C_{35} homohopanos, mostrando a maior resistência de C_{35} pentaquishomohopano durante o processo de biodegradação.

Os norhopanos, 18 α (H)-22,29,30-trisnorneohopano (Ts) e 17 α (H)-22,29,30-trisnorhopano (Tm) permaneceram quase inalterados levando a uma pequena variação na razão Ts/Tm, assim como ocorreu para os aeróbios [**Tabela 44**].

Para a série de norhopanos (C_{27} - C_{34} 17 α ,21 β -25-norhopanos) observou-se um fenômeno inverso ao que ocorreu com os aeróbios, ou seja, houve remoção de ambos hopanos e 25-norhopanos com maior degradação de hopanos. Em princípio poder-se-ia concluir que a degradação dos hopanos e norhopanos segue caminhos comuns em condições anaeróbicas, entretanto Bost *et al.* (2001) mostraram que em condições aeróbicas também ocorre a remoção simultânea de ambos hopanos e norhopanos,

contrastando com o que foi observado no nosso experimento. Portanto só pode ser concluído que a preferência de degradação desses compostos depende primariamente da microbiota e não da presença ou ausência de oxigênio.

Devido à biodegradação de hopanos antes dos 25-norhopanos ocorreu uma diminuição da razão 25-NH [**Tabela 44**, *pág. 219*], evidenciando mais uma vez a resistência dos 25-norhopanos relativa aos hopanos.

A **Figura 75** mostra o incremento da biodegradação para a série de norhopanos monitorados através do SIM m/z 177 e a **Tabela 33** contém a concentração e as taxas de biodegradação para esta série.

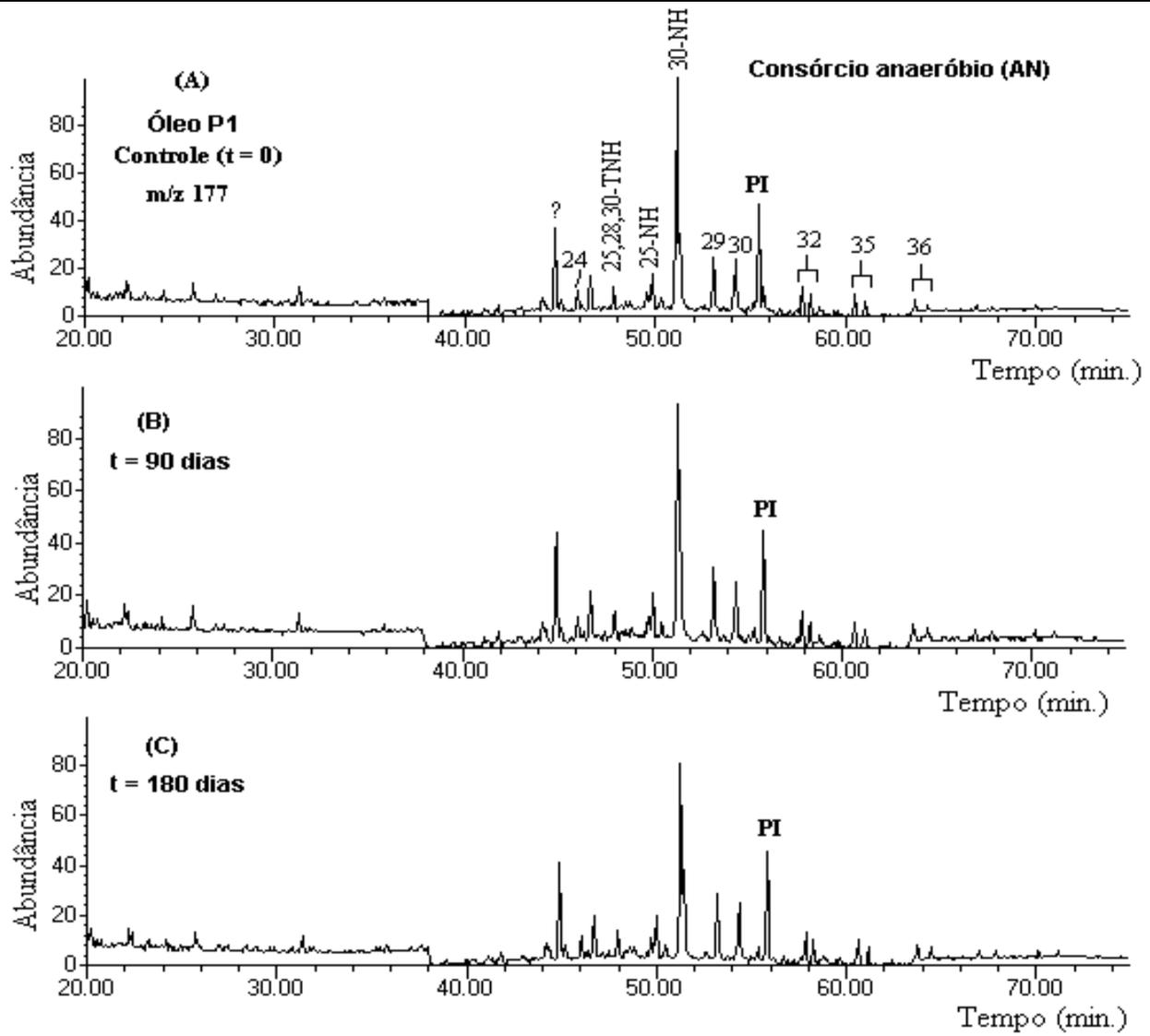


Figura 75. SIM m/z 177 para P1 disperso no meio com consórcio anaeróbico em (B) 90 e (C) 180 dias. 25,28,30-TNH = 17 α (H),18 α (H),21 β (H)-25,28,30-trisnorhopano; 25-NH = 17 α (H),21 β (H)-25-norhopano; 30-NH = 17 α (H),21 β (H)-30-norhopano; PI = Padrão Interno (5 α -colestano-3-ona).

Tabela 33. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para a série de norhopanos detectados através do SIM m/z 191 e m/z 177 com P1 disperso no meio para consórcio anaeróbio

Pico	Compostos	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%)*		
		0	30	60
- ^a	17 α (H),18 α (H),21 β (H)- 25,28,30-trisnorhopano	3,7 \pm 2,3	3,6 / 3 \pm 1,6	3,1 / 16 \pm 1,0
26 ^b	17 α (H),18 α (H),21 β (H)- 28,30-bisnorhopano	4,6 \pm 1,7	4,4 / 4 \pm 3,1	3,4 / 26 \pm 3,8
27 ^c	17 α (H),21 β (H)-25-norhopano	3,8 \pm 1,9	3,4 / 11 \pm 3,2	2,8 / 26 \pm 1,7
28 ^d	17 α (H),21 β (H)-30-norhopano	70,2 \pm 2,2	65,8 / 6 \pm 2,2	40,2 / 43 \pm 1,4
29 ^e	17 β (H),21 α (H)-normoretano	4,0 \pm 1,4	3,8 / 5 \pm 1,9	2,9 / 28 \pm 1,7

^a17 α (H),18 α (H),21 β (H)-25,28,30-trisnorhopano em m/z 177 (Figuras 45 e 46); ^b17 α (H),18 α (H),21 β (H)-28,30-bisnorhopano em m/z 191 (Figuras 38 e 39); ^c17 α (H),21 β (H)-25-norhopano em m/z 191 e 177; ^d17 α (H),21 β (H)-30-norhopano em m/z 191 e 177; ^e17 β (H),21 α (H)-normoretano em m/z 191 e 177.

3.2.2.1.4 Esteranos Regulares

O cromatograma para esteranos regulares e diasteranos analisados através do SIM m/z 217 na presença do consórcio anaeróbico é apresentado na **Figura 76**.

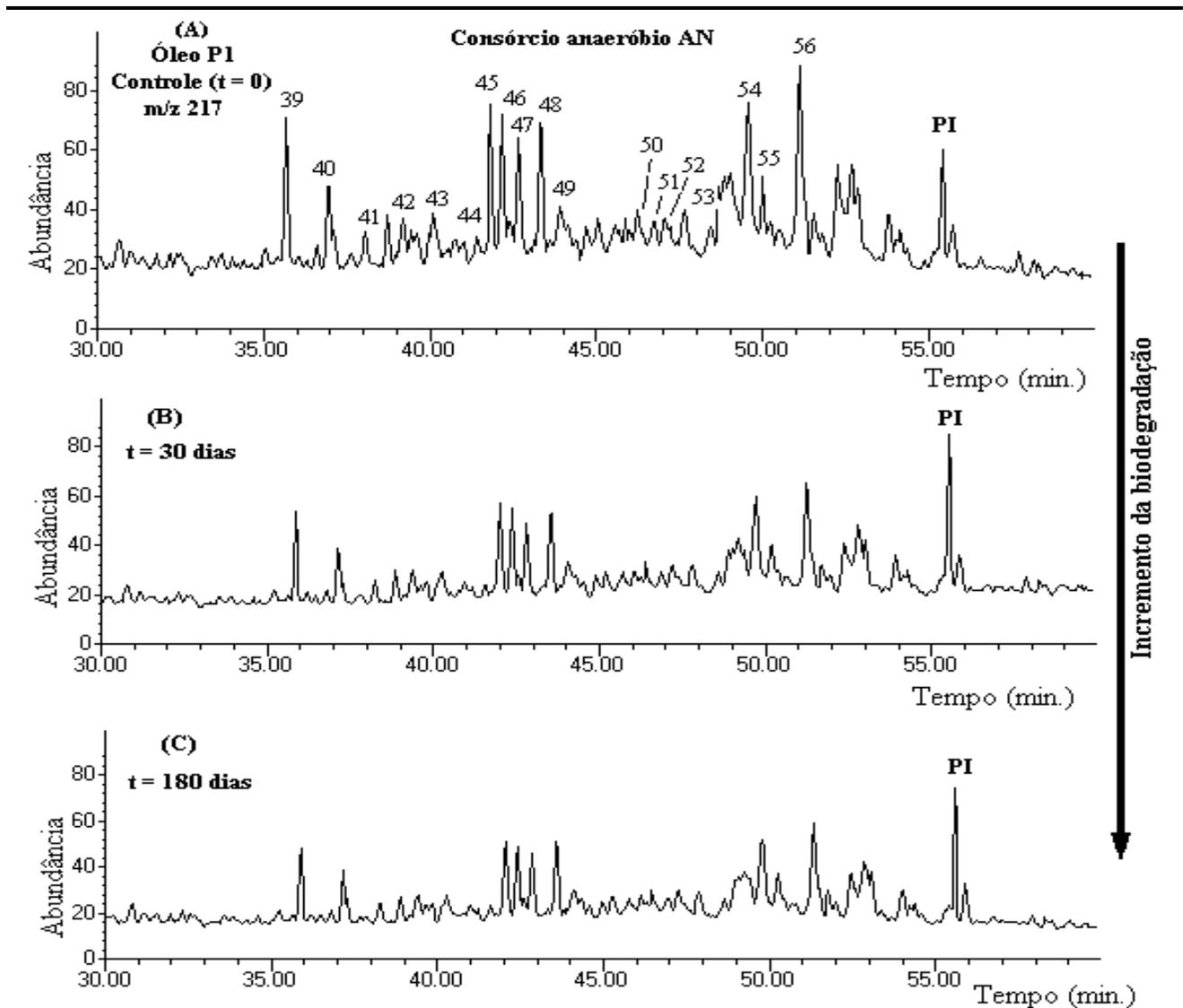


Figura 76. SIM m/z 217 para PI disperso no meio mostrando o incremento da biodegradação de esteranos normais e diasteranos com consórcio anaeróbico AN. PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

As concentrações e taxas de biodegradação para esta classe utilizando P1 disperso no meio e o consórcio anaeróbio é mostrado na **Tabela 34**.

Tabela 34. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para esteranos em m/z 217 com P1 adicionado direto ao meio para consórcio anaeróbio

Pico	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%)*		
	Tempo (dias)		
	0	90	180
39	36,4 \pm 1,0	24,0 / 34 \pm 2,2	22,8 / 37 \pm 1,1
40	13,8 \pm 2,7	9,2 / 35 \pm 1,5	8,5 / 38 \pm 1,6
41	5,8 \pm 3,0	3,9 / 33 \pm 0,4	3,4 / 41 \pm 2,8
42	4,9 \pm 3,2	3,3 / 33 \pm 1,1	3,0 / 39 \pm 2,2
43	4,6 \pm 0,8	3,3 / 28 \pm 1,6	3,1 / 37 \pm 1,2
44	2,5 \pm 2,5	2,0 / 20 \pm 0,5	1,6 / 36 \pm 1,5
45	34,2 \pm 2,6	14,8 / 57 \pm 2,2	10,8 / 68 \pm 1,7
46	35,1 \pm 2,1	15,6 / 56 \pm 1,0	9,9 / 72 \pm 0,6
47	22,1 \pm 2,4	11,3 / 49 \pm 0,7	6,2 / 72 \pm 2,1
48	24,6 \pm 2,4	10,2 / 59 \pm 1,0	4,8 / 80 \pm 1,5
49	4,5 \pm 1,6	3,6 / 20 \pm 1,4	3,0 / 33 \pm 1,1
50	3,3 \pm 2,7	2,1 / 36 \pm 1,2	1,3 / 61 \pm 1,5
51	2,1 \pm 1,5	1,2 / 43 \pm 1,5	0,8 / 62 \pm 0,7
52	2,4 \pm 2,0	1,3 / 46 \pm 0,6	0,9 / 63 \pm 1,2
53	3,6 \pm 1,7	1,9 / 47 \pm 1,2	1,3 / 64 \pm 1,5
54	33,8 \pm 1,9	18,4 / 46 \pm 1,4	16,2 / 52 \pm 2,0
55	4,0 \pm 2,2	2,7 / 33 \pm 1,2	1,8 / 55 \pm 2,1
56	36,1 \pm 1,0	24,8 / 31 \pm 1,1	15,6 / 57 \pm 1,0

*Média de duplicata, desvio padrão (n=2).

Contrário ao observado com os consórcios aeróbios, os esteranos normais e diasteranos foram mais biodegradados que os hopanos pelos anaeróbios, porém, seguiu a mesma ordem de preferência relatada com os aeróbios: $\alpha\alpha\alpha\ 20R \gg \alpha\beta\beta\ 20R + \alpha\beta\beta\ 20S \geq \alpha\alpha\alpha\ 20S \gg$ diasteranos, com degradação seletiva de $C_{27} > C_{28} > C_{29}$ [Tabela 34]. Como houve remoção preferencial de esteranos relativo aos hopanos, a razão esterano/hopano diminuiu com o aumento da biodegradação [Tabela 44, *pág. 219*], em oposição aos experimentos em condição aeróbia que mostrou aumento para esta razão.

A partir destes resultados foi possível ampliar observações anteriores e inferir que a degradação preferencial de hopanos ou esteranos ou produção (enriquecimento) de norhopanos não ocorre segundo uma rota bioquímica específica mas é resultado de um conjunto complexo de múltiplas reações microbianas, portanto variações na microbiota acarretam preferências distintas na biodegradação que não podem ser atribuídas exclusivamente a um ou outro microrganismo anaeróbio ou aeróbio, mas possivelmente a associação entre eles, de acordo com a hipótese sugerida neste trabalho.

3.2.2.2 Análise da fração neutra saturada com petróleo adsorvido em matrizes (areia e folhelhos)

3.2.2.2.1 n-alcenos e isoprenóides

As Figuras 77, 78 e 79 apresentam os cromatogramas de íons extraídos de $m/z\ 71$ para o consórcio anaeróbio com P1 adsorvido em areia e nos folhelhos FSA e FB, respectivamente.

Como não houve alterações significativas nas taxas de biodegradação para *n*-alcenos e isoprenóides de 30 a 90 dias e de 120 a 180 dias, a Tabela 35 mostra apenas as taxas de biodegradação para 90 e 180 dias.

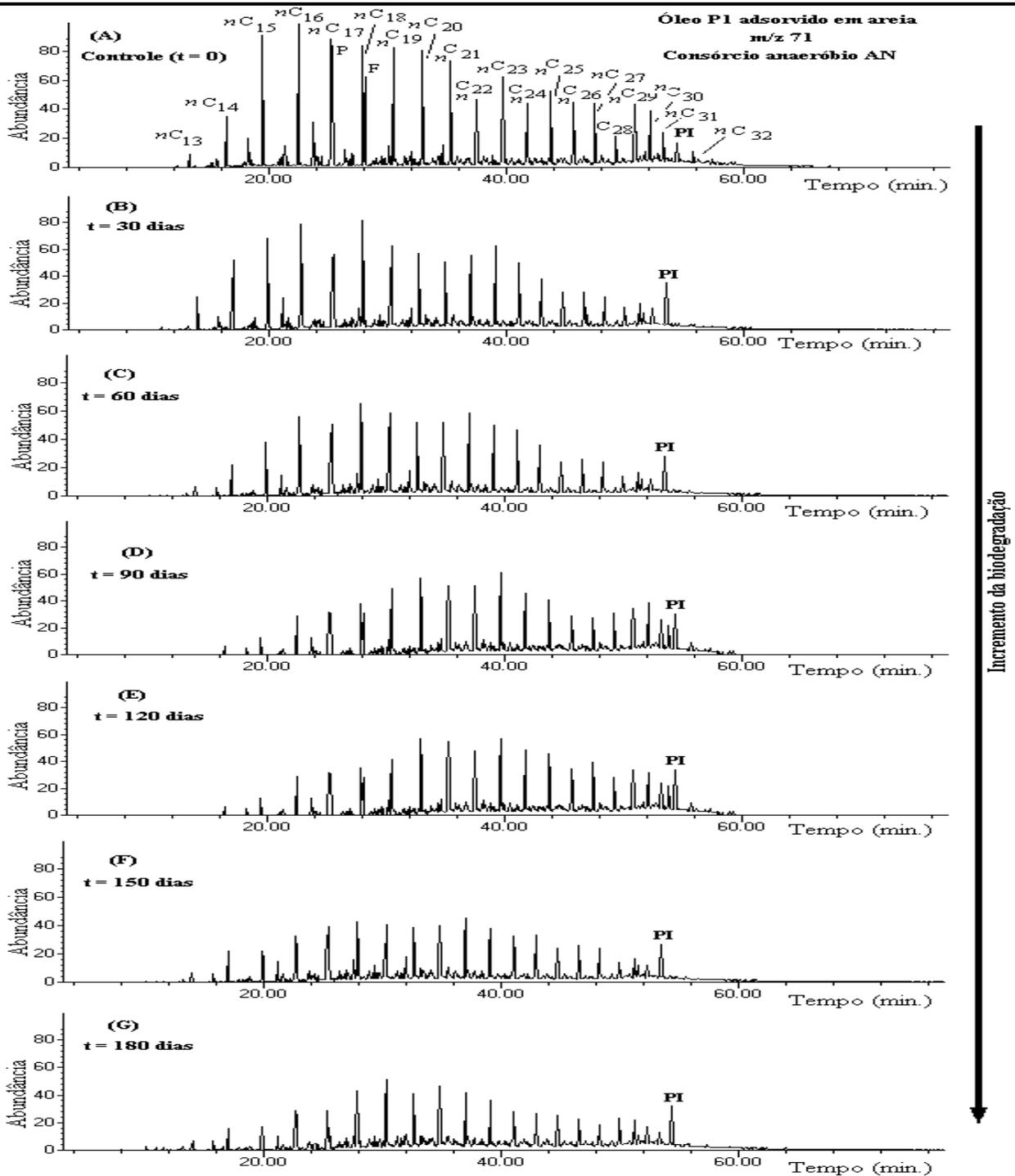


Figura 77. RIC m/z 71 mostrando o incremento da biodegradação de P1 adsorvido em areia com consórcio anaeróbio. nC_{13} - nC_{32} = n -alcanos; P = Pristano; F = Fitano; PI = Padrão Interno (5 α -colestan-3-ona).

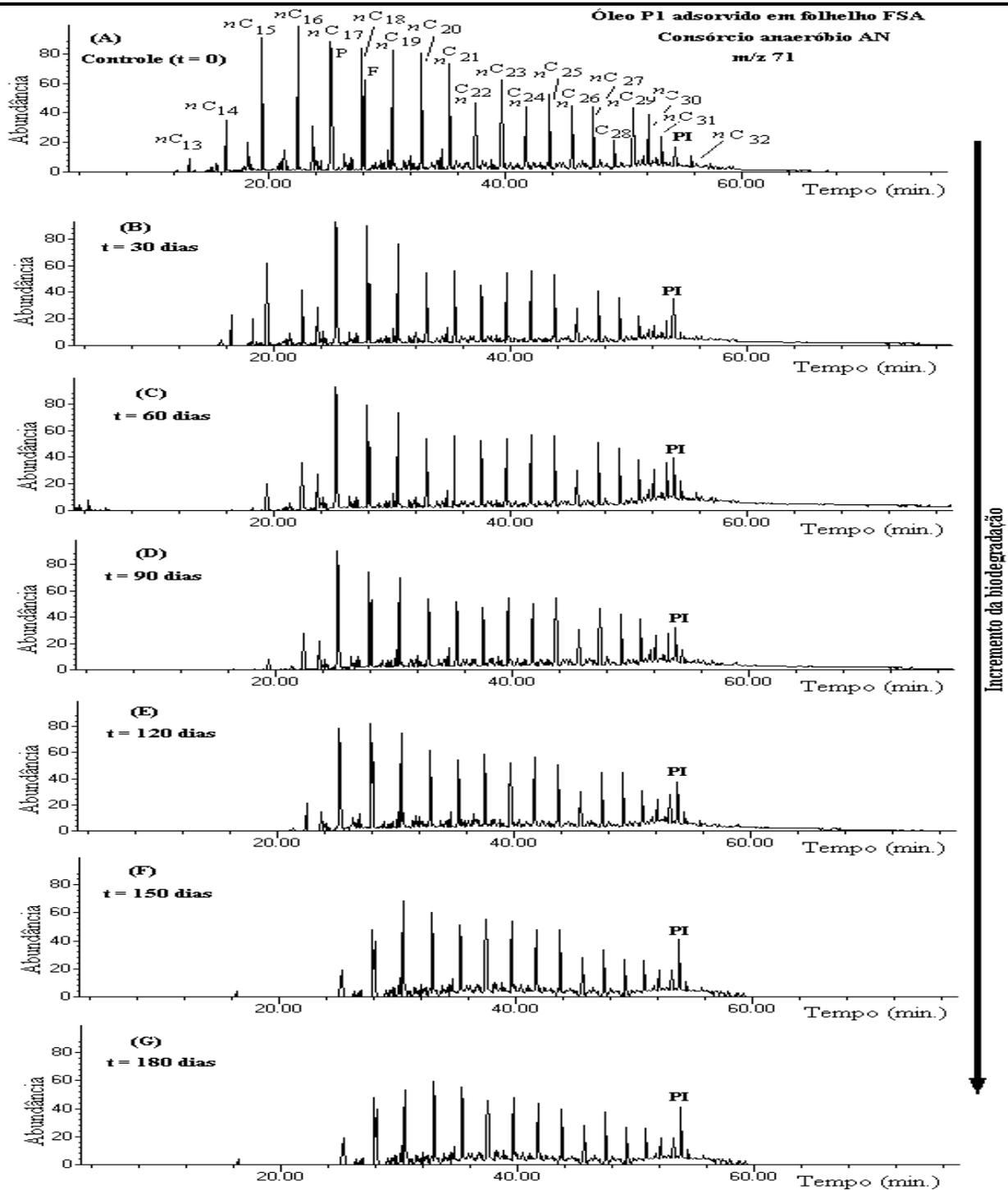


Figura 78. RIC m/z 71 mostrando o incremento da biodegradação de PI adsorvido em folheto FSA com consórcio anaeróbio. nC_{13} - nC_{32} = n -alcanos; P = Pristano; F = Fitano; PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

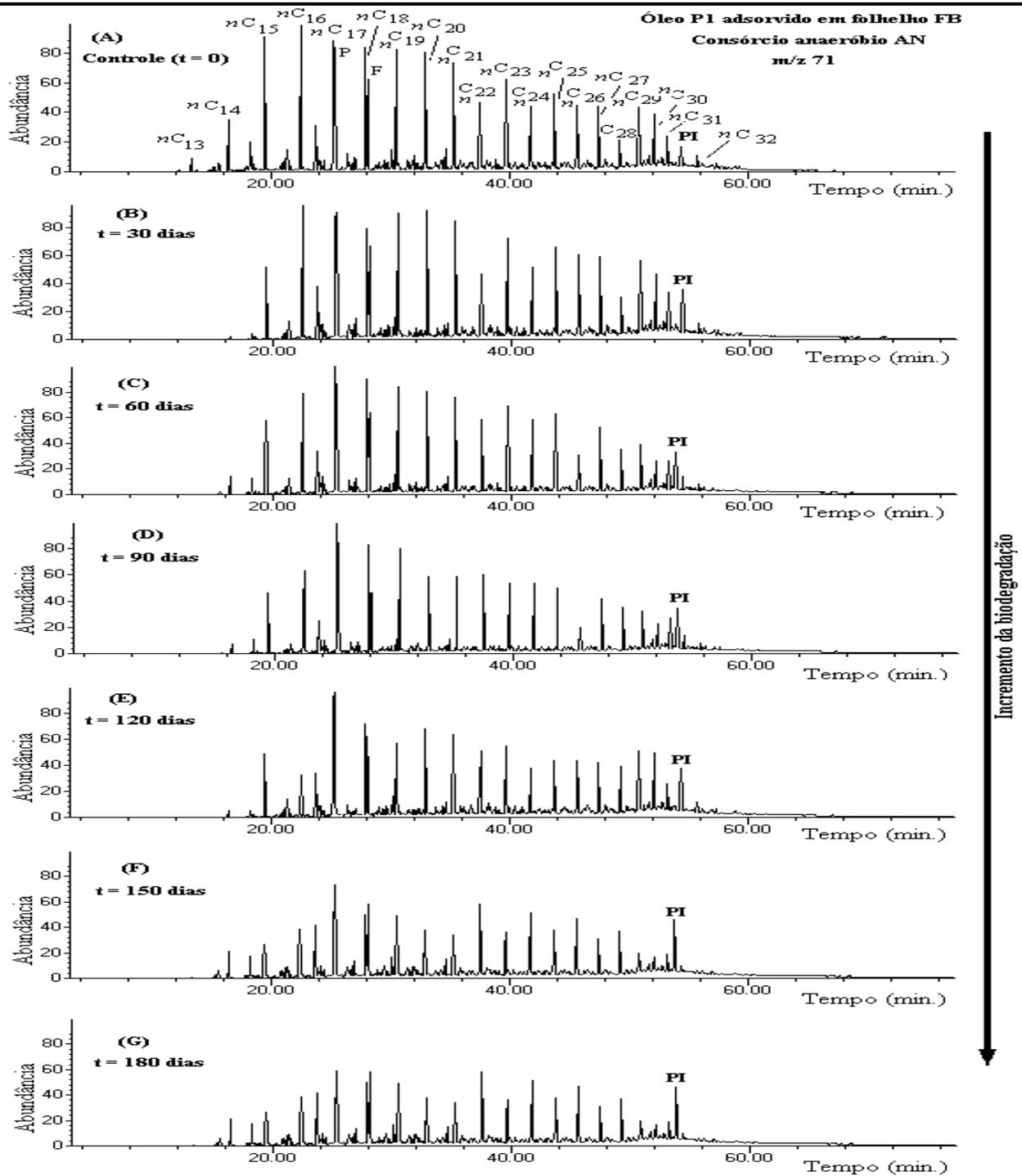


Figura 79. RIC m/z 71 mostrando o incremento da biodegradação de P1 adsorvido em folhelho FB pelo consórcio anaeróbio. nC_{13} - nC_{32} = n -alcanos; P = Pristano; F = Fitano; PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

Tabela 35. Taxas de biodegradação (%) para *n*-alcanos e isoprenóides utilizando P1 adsorvido em areia e folhelhos FSA e FB com consórcio anaeróbio em 90 e 180 dias

Pico	Composto	Fórmula	MM ^a	Taxas de biodegradação (%) ^b /Tempo (dias)					
				P1 em Areia		P1 com FSA		P1 com FB	
				90	180	90	180	90	180
<i>n</i> C ₁₃	<i>n</i> -Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	184	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₄	<i>n</i> -Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀	198	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₅	<i>n</i> -Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	212	85 ± 1,3	> 99 ± 1,5	85 ± 1,0	92 ± 2,8	82 ± 1,0	89 ± 1,1
<i>n</i> C ₁₆	<i>n</i> -Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	226	82 ± 4,0	> 99 ± 1,3	66 ± 1,3	81 ± 3,2	65 ± 0	76 ± 1,3
<i>n</i> C ₁₇	<i>n</i> -Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	240	48 ± 2,1	98 ± 0,9	43 ± 0,5	93 ± 1,0	48 ± 1,2	98 ± 0,4
P	Pristano	C ₁₉ H ₄₀	268	46 ± 1,2	93 ± 0,5	38 ± 3,0	87 ± 0,4	35 ± 0,2	88 ± 2,2
<i>n</i> C ₁₈	<i>n</i> -Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	254	68 ± 1,1	97 ± 2,1	55 ± 1,9	83 ± 0,9	51 ± 0,6	98 ± 1,5
F	Fitano	C ₂₀ H ₄₂	282	41 ± 0,5	87 ± 1,2	36 ± 1,6	81 ± 0,8	31 ± 0	82 ± 0,6
<i>n</i> C ₁₉	<i>n</i> -Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	268	55 ± 1,2	91 ± 0,6	34 ± 1,4	91 ± 1,2	34 ± 1,7	82 ± 1,6
<i>n</i> C ₂₀	<i>n</i> -Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	282	58 ± 1,2	90 ± 2,2	33 ± 0,9	75 ± 3,0	34 ± 1,0	70 ± 0,2
<i>n</i> C ₂₁	<i>n</i> -Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	296	66 ± 1,5	91 ± 1,5	41 ± 2,1	91 ± 0,9	43 ± 2,2	57 ± 0,6
<i>n</i> C ₂₂	<i>n</i> -Docosano	C ₂₂ H ₄₆	310	57 ± 1,6	82 ± 0,9	29 ± 1,5	69 ± 1,1	41 ± 2,0	52 ± 2,6
<i>n</i> C ₂₃	<i>n</i> -Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	324	48 ± 1,1	91 ± 0,8	55 ± 1,4	90 ± 2,2	26 ± 2,0	56 ± 1,2
<i>n</i> C ₂₄	<i>n</i> -Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	338	57 ± 1,0	83 ± 1,3	19 ± 1,1	68 ± 1,4	36 ± 1,1	47 ± 0,6
<i>n</i> C ₂₅	<i>n</i> -Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	352	46 ± 0,8	93 ± 1,8	46 ± 2,9	69 ± 0,6	33 ± 2,1	54 ± 0,4
<i>n</i> C ₂₆	<i>n</i> -Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	366	56 ± 1,4	90 ± 0,6	31 ± 0,5	65 ± 1,4	21 ± 1,8	45 ± 1,8
<i>n</i> C ₂₇	<i>n</i> -Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	380	65 ± 1,7	94 ± 1,6	55 ± 1,4	93 ± 0,8	24 ± 0	46 ± 1,6
<i>n</i> C ₂₈	<i>n</i> -Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	394	44 ± 1,5	89 ± 1,0	44 ± 2,2	63 ± 0,9	29 ± 1,6	48 ± 0,5
<i>n</i> C ₂₉	<i>n</i> -Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	408	53 ± 1,8	93 ± 2,0	44 ± 1,3	86 ± 1,1	36 ± 0,9	52 ± 0,4
<i>n</i> C ₃₀	<i>n</i> -Triacontano	C ₃₀ H ₆₂	422	71 ± 1,3	95 ± 1,1	58 ± 1,4	75 ± 1,0	20 ± 1,9	51 ± 1,0
<i>n</i> C ₃₁	<i>n</i> -Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	436	71 ± 2,1	97 ± 1,6	60 ± 1,2	96 ± 0,6	17 ± 1,4	53 ± 1,4
<i>n</i> C ₃₂	<i>n</i> -Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆	450	41 ± 2,0	nd	nd	nd	31 ± 2,3	nd

^aMM = Massa Molecular; ^bMédia de duplicata, desvio padrão (n=2).

A biodegradação de *n*-alcanos e isoprenóides utilizando petróleo adicionado nas diferentes matrizes pelo consórcio anaeróbio foi mais efetiva do que quando se utilizou o petróleo não adsorvido, porém menos pronunciada e mais lenta do que nos ensaios em condições aeróbias. Estes resultados mostram mais uma vez que a matriz influencia na biodegradação do petróleo acelerando o processo e também que em anaerobiose o processo é mais demorado. Entre as matrizes a areia foi mais eficiente, devido a maior quantidade de silicatos, que o folhelho FSA seguido pelo folhelho FB.

De forma semelhante aos aeróbios, nestes experimentos houve biodegradação de *n*-alcanos antes dos isoprenóides, resultando, mais uma vez, no aumento das razões P/nC_{17} e F/nC_{18} e na diminuição da razão P/F [Tabela 43, *pág. 213*].

Seguindo o que foi observado no experimento com P1 disperso no meio, aqui também notou-se o aumento do IPC ao longo do experimento, ratificando que os **consórcios anaeróbios preferem degradar alcanos com número ímpar de carbonos relativo aos alcanos com número par de carbonos** [Tabela 43].

3.2.2.2 Sesquiterpanos Bicíclicos

O consórcio anaeróbio com P1 adsorvido em areia degradou os sesquiterpanos bicíclicos mais efetivamente comparado ao ensaio com P1 adsorvido em folhelho FSA. Estes mesmos compostos permaneceram quase inalterados quando o consórcio anaeróbio foi usado com P1 adsorvido em folhelho FB. A **Figura 80** mostra estes resultados.

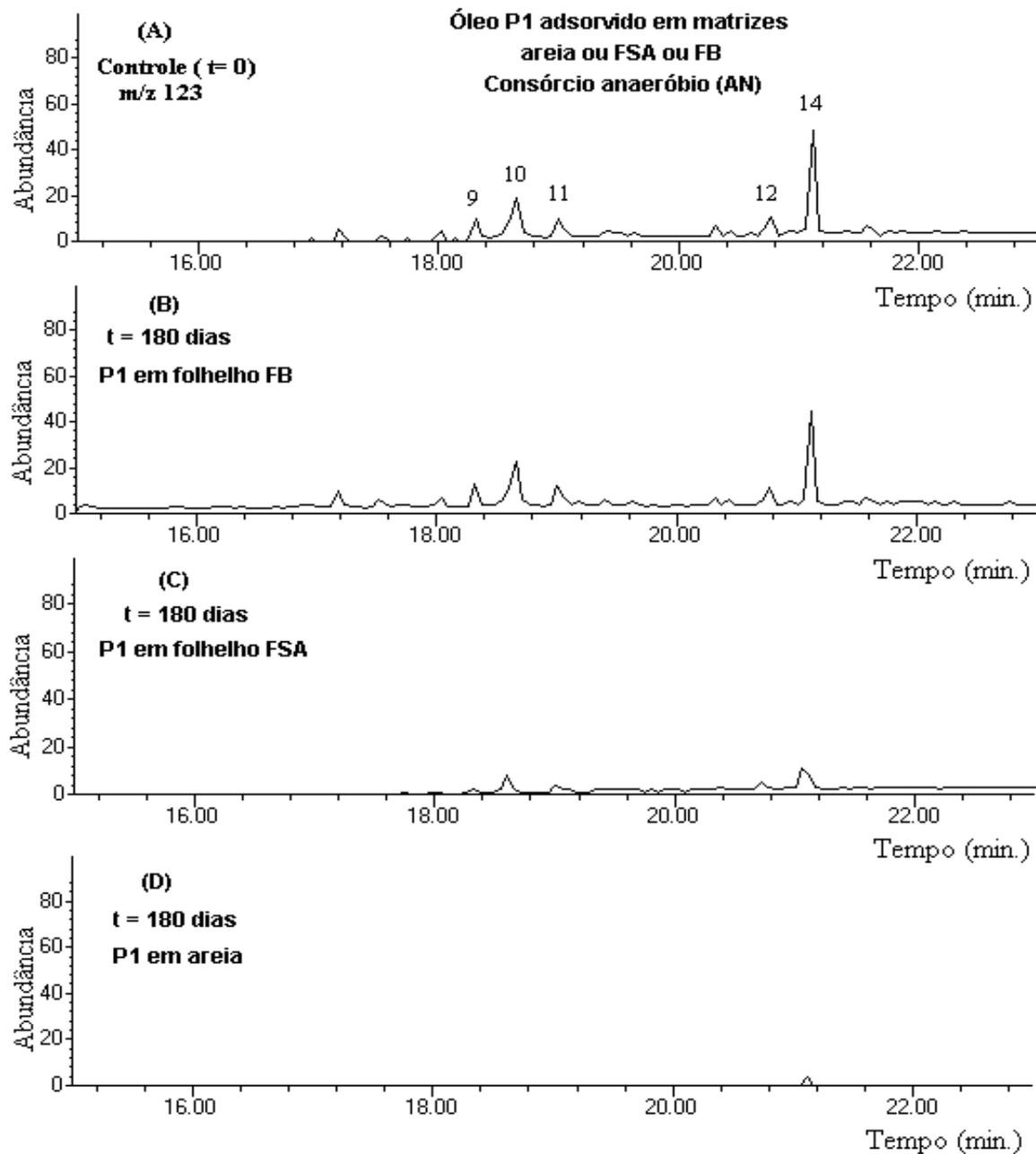


Figura 80. Sesquiterpanos bicíclicos monitorados através do íon m/z 123 no ensaio com P1 adsorvido em (B) FB, (C) FSA e (D) areia para o consórcio anaeróbio em 180 dias.

Diferentemente do que ocorreu nos experimentos em condições aeróbias, o bicíclico $8\beta(H)$ -homodrimano foi severamente biodegradado pelo consórcio anaeróbio quando P1 está adsorvido em areia, evidenciando mais uma vez que matrizes ricas em

silicatos favorece a fixação dos microrganismos, aumentando a biomassa e a biodegradação dos componentes do petróleo.

3.2.2.2.3 Terpanos Tricíclicos, Tetracíclicos e Pentacíclicos

A **Figura 81** mostra o incremento da biodegradação para terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos monitorados através do SIM m/z 191 e a **Tabela 36** contém a concentração e as taxas de biodegradação para estes compostos utilizando condições anaeróbias e P1 adsorvido em diferentes matrizes.

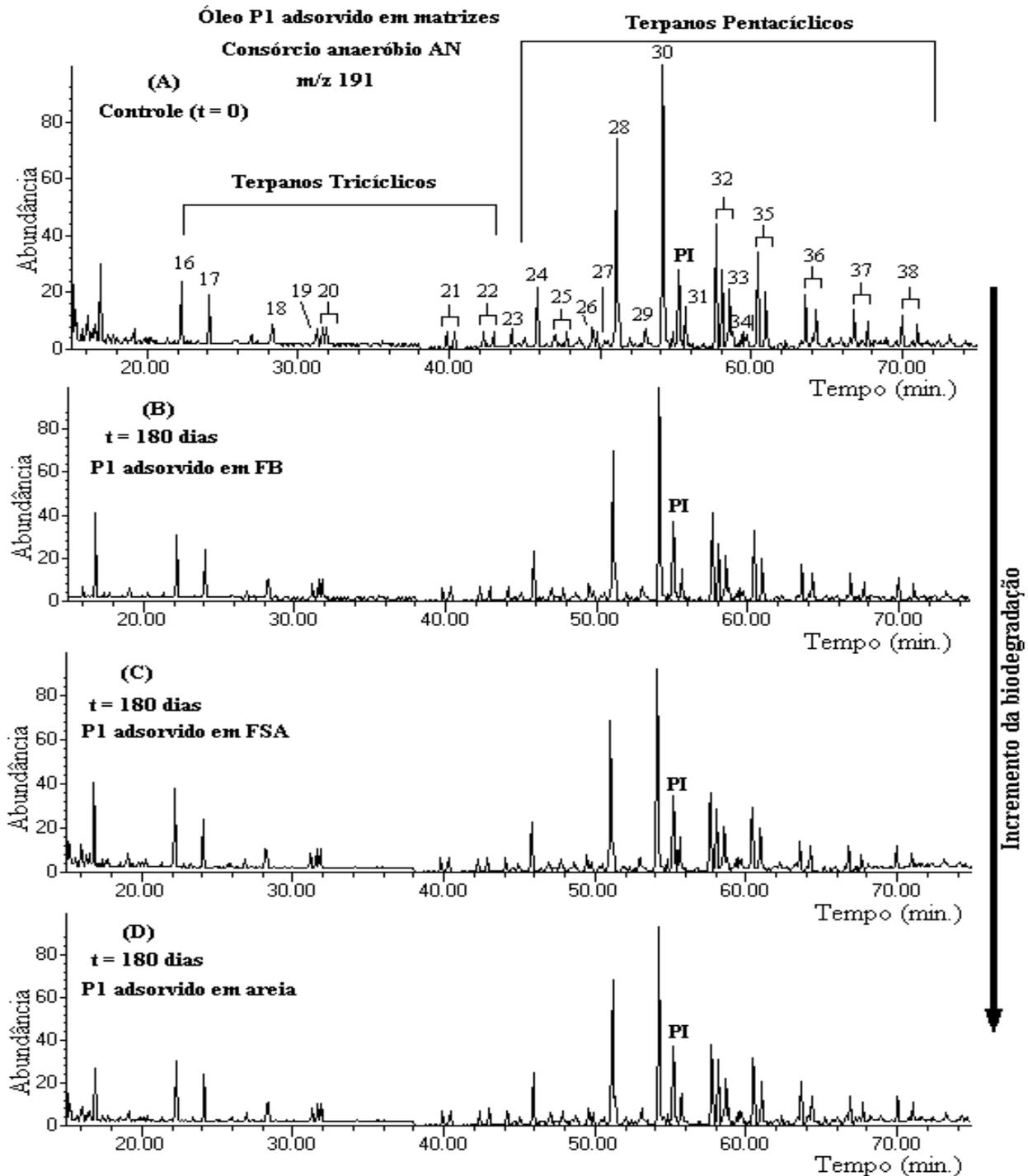


Figura 81. SIM m/z 191 para consórcio anaeróbio com P1 adsorvido em (B) FB, (C) FSA e (D) areia em 180 dias. PI = Padrão Interno (5α -colestan-3-ona).

Tabela 36. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos monitorando m/z 191 com P1 adsorvido em areia, FSA e FB em condições anaeróbias

Pico	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%)*						
	Controle	P1 em areia		P1 em FSA		P1 em FB	
	0	90	180	90	180	90	180
16	33,0 \pm 3,0	27,9 / 15 \pm 2,5	21,5 / 35 \pm 1,8	27,8 / 16 \pm 3,2	26,6 / 19 \pm 1,1	28,0 / 15 \pm 1,0	27,5 / 17 \pm 2,6
17	16,5 \pm 1,0	13,4 / 19 \pm 2,7	11,0 / 33 \pm 3,4	15,0 / 9 \pm 1,2	11,5 / 30 \pm 2,4	15,4 / 7 \pm 3,0	12,3 / 25 \pm 3,2
18	5,9 \pm 2,7	5,2 / 12 \pm 1,9	4,6 / 22 \pm 1,5	5,4 / 8 \pm 1,9	5,0 / 15 \pm 2,9	5,6 / 5 \pm 3,8	5,2 / 12 \pm 1,0
19	4,8 \pm 3,8	4,3 / 10 \pm 3,6	3,6 / 25 \pm 1,4	4,4 / 8 \pm 2,0	4,1 / 15 \pm 1,4	4,4 / 8 \pm 2,7	4,2 / 13 \pm 1,1
20S	6,0 \pm 3,2	5,6 / 7 \pm 1,7	3,8 / 37 \pm 3,8	5,6 / 7 \pm 2,4	5,0 / 17 \pm 3,1	5,7 / 5 \pm 3,2	5,3 / 12 \pm 1,8
20R	6,1 \pm 0,8	5,0 / 18 \pm 2,6	3,4 / 44 \pm 2,0	5,1 / 16 \pm 2,7	4,0 / 34 \pm 1,9	5,3 / 13 \pm 0,8	4,2 / 31 \pm 2,0
21S	5,3 \pm 2,1	4,5 / 15 \pm 1,5	3,2 / 39 \pm 2,3	5,0 / 7 \pm 1,4	3,4 / 36 \pm 1,5	5,1 / 4 \pm 2,1	3,6 / 32 \pm 1,6
21R	5,9 \pm 2,6	3,8 / 36 \pm 2,5	3,0 / 49 \pm 3,1	4,0 / 32 \pm 1,2	3,1 / 47 \pm 2,3	4,4 / 25 \pm 2,6	3,6 / 39 \pm 3,1
22S	4,9 \pm 2,4	4,0 / 18 \pm 1,0	2,9 / 41 \pm 1,2	4,2 / 14 \pm 1,4	3,8 / 22 \pm 2,4	4,5 / 8 \pm 2,6	4,0 / 18 \pm 1,7
22R	5,2 \pm 2,4	4,0 / 23 \pm 2,2	3,0 / 42 \pm 1,7	4,4 / 15 \pm 2,0	3,2 / 38 \pm 2,4	4,6 / 12 \pm 2,3	3,7 / 29 \pm 1,4
23	5,4 \pm 1,6	4,9 / 9 \pm 1,0	3,7 / 31 \pm 1,6	5,0 / 7 \pm 3,8	4,0 / 26 \pm 1,7	5,0 / 7 \pm 1,4	4,6 / 15 \pm 2,5
24	15,6 \pm 2,7	14,4 / 8 \pm 1,8	9,2 / 41 \pm 1,9	14,6 / 6 \pm 0,9	11,3 / 28 \pm 2,7	15,0 / 4 \pm 1,2	13,6 / 13 \pm 1,4
25S	4,5 \pm 2,0	4,2 / 7 \pm 1,5	3,2 / 29 \pm 2,3	4,3 / 4 \pm 3,1	3,7 / 18 \pm 1,7	4,4 / 2 \pm 2,2	3,7 / 18 \pm 1,9
25R	4,8 \pm 1,5	4,0 / 17 \pm 1,7	2,8 / 42 \pm 2,0	4,1 / 15 \pm 1,4	3,0 / 38 \pm 1,8	4,2 / 13 \pm 1,7	3,4 / 29 \pm 2,2
26	4,6 \pm 1,7	4,2 / 9 \pm 3,1	3,2 / 30 \pm 3,8	4,4 / 4 \pm 2,2	3,5 / 24 \pm 1,7	4,4 / 4 \pm 1,4	4,0 / 13 \pm 2,5
27	3,8 \pm 1,9	3,2 / 16 \pm 2,2	2,6 / 32 \pm 1,7	3,4 / 11 \pm 1,9	2,9 / 24 \pm 1,9	3,6 / 5 \pm 3,8	3,2 / 16 \pm 3,1
28	70,2 \pm 2,2	65,5 / 7 \pm 2,2	39,9 / 43 \pm 1,4	66,5 / 5 \pm 1,4	47,2 / 33 \pm 1,9	68,4 / 3 \pm 1,9	55,0 / 22 \pm 1,4

29	4,0 ± 1,4	3,6 / 10 ± 1,9	2,7 / 33 ± 1,7	3,7 / 8 ± 2,0	3,0 / 25 ± 1,7	3,7 / 8 ± 2,7	3,4 / 15 ± 1,7
30	120,0 ± 1,9	111,0 / 8 ± 1,9	48,7 / 59 ± 2,5	115,8 / 4 ± 2,2	54,5 / 55 ± 1,4	117,8 / 2 ± 1,5	88,8 / 26 ± 2,0
31	10,2 ± 1,4	8,2 / 20 ± 3,8	4,6 / 55 ± 2,7	9,4 / 8 ± 3,1	5,0 / 51 ± 3,8	9,8 / 4 ± 1,7	6,1 / 40 ± 1,9
32S	34,2 ± 2,5	31,8 / 7 ± 1,7	18,0 / 47 ± 1,5	31,8 / 7 ± 1,4	29,2 / 15 ± 0,9	32,8 / 4 ± 2,7	31,0 / 9 ± 1,7
32R	13,9 ± 1,7	11,6 / 17 ± 1,4	6,6 / 53 ± 2,0	11,9 / 14 ± 1,9	10,4 / 25 ± 1,5	12,4 / 11 ± 1,9	11,2 / 19 ± 2,2
33	12,8 ± 1,4	9,2 / 28 ± 1,4	7,4 / 42 ± 4,0	9,9 / 23 ± 2,6	8,0 / 38 ± 2,2	11,5 / 10 ± 2,0	8,3 / 35 ± 1,7
34	3,8 ± 2,2	2,7 / 29 ± 3,1	1,6 / 58 ± 1,5	3,2 / 16 ± 1,5	1,7 / 55 ± 2,0	3,4 / 11 ± 0,2	2,4 / 37 ± 0,9
35S	15,2 ± 1,0	13,4 / 12 ± 2,5	8,6 / 43 ± 2,2	13,7 / 10 ± 2,0	11,0 / 28 ± 0,9	14,2 / 7 ± 3,2	12,6 / 17 ± 0,9
35R	12,7 ± 1,1	7,0 / 45 ± 2,4	6,2 / 51 ± 1,3	8,2 / 35 ± 0,8	6,5 / 49 ± 0,8	8,5 / 33 ± 1,2	6,7 / 47 ± 3,4
36S	12,6 ± 2,2	8,0 / 37 ± 1,8	7,2 / 43 ± 4,3	8,9 / 29 ± 2,3	7,2 / 43 ± 5,0	10,0 / 21 ± 2,4	7,6 / 40 ± 1,6
36R	6,2 ± 1,8	4,6 / 26 ± 6,1	3,0 / 52 ± 3,1	4,8 / 23 ± 2,1	3,0 / 52 ± 2,2	4,8 / 23 ± 1,0	3,4 / 45 ± 0,1
37S	4,8 ± 1,3	4,0 / 17 ± 0,2	2,7 / 44 ± 1,4	4,4 / 8 ± 1,8	3,2 / 33 ± 1,1	4,4 / 8 ± 2,2	3,5 / 27 ± 2,1
37R	3,2 ± 1,4	2,5 / 22 ± 1,5	1,6 / 50 ± 1,5	2,8 / 13 ± 2,0	1,7 / 47 ± 3,1	2,8 / 13 ± 1,1	2,2 / 31 ± 1,4
38S	4,1 ± 3,1	3,6 / 12 ± 4,1	2,4 / 41 ± 1,5	3,7 / 8 ± 0,4	2,4 / 41 ± 1,8	3,8 / 8 ± 3,2	3,2 / 22 ± 3,1
38R	2,8 ± 0,9	2,2 / 21 ± 1,0	1,5 / 46 ± 1,5	2,4 / 14 ± 0,9	1,8 / 36 ± 2,4	2,5 / 11 ± 0,9	2,0 / 29 ± 1,3

*Média de duplicata, desvio padrão (n=2).

O consórcio anaeróbico com P1 adsorvido em matrizes apresentou o mesmo comportamento observado para o experimento que utiliza P1 disperso no meio, porém com maior taxa de biodegradação. Ou seja, houve remoção preferencial de terpanos tricíclicos C₂₈ e C₂₉ (**picos 21 e 22**, *Figura 81, Tabela 36*) relativo ao C₃₅ hopano (**pico 38**, *Figura 81, Tabela 36*), levando a uma diminuição das razões TT [**Tabela 44**, *pág.219*], contrário ao que se observou para os aeróbios. Os terpanos tricíclicos de C₂₃-C₃₁ (**picos 16-18, 20-22 e 25**, *Figura 81, Tabela 36*) foram removidos após degradação de hopanos com maior biodegradação no ensaio com P1 adsorvido em areia (de 22 a 49 % em 180 dias), seguido do ensaio com P1 adsorvido em FSA (de 15 a 47 % em 180 dias) e com FB (de 12 a 39 % em 180 dias).

A degradação de homohopanos (**picos 32, 35-38**, *Figura 81, Tabela 36*), assim como foi visto no ensaio com anaeróbios e P1 disperso no meio, seguiu a ordem preferencial dos epímeros 22R de menor peso molecular [C₃₁ > C₃₂ > C₃₃ > C₃₄ > C₃₅], independente da matriz utilizada, contrário aos aeróbios que mostraram remoção preferencial dos homólogos de maior peso molecular. O índice de homohopano [IH, **Tabela 43**] também confirma a remoção preferencial de C₃₁-C₃₅ homohopanos, mostrando a maior resistência de C₃₅ pentaquishomohopano durante o processo de biodegradação.

Para a série de norhopanos (C₂₇-C₃₄ 17 α ,21 β -25-norhopanos) também houve remoção de ambos hopanos e 25-norhopanos com maior degradação de hopanos, levando a uma diminuição da razão 25-NH, semelhante ao observado no ensaio com P1 disperso no meio também em anaerobiose [**Tabela 44**, *pág. 219*].

A **Figura 82** mostra o incremento da biodegradação para a série de norhopanos monitorados através do SIM *m/z* 177 e a **Tabela 37** contém a concentração e as taxas de biodegradação para esta série.

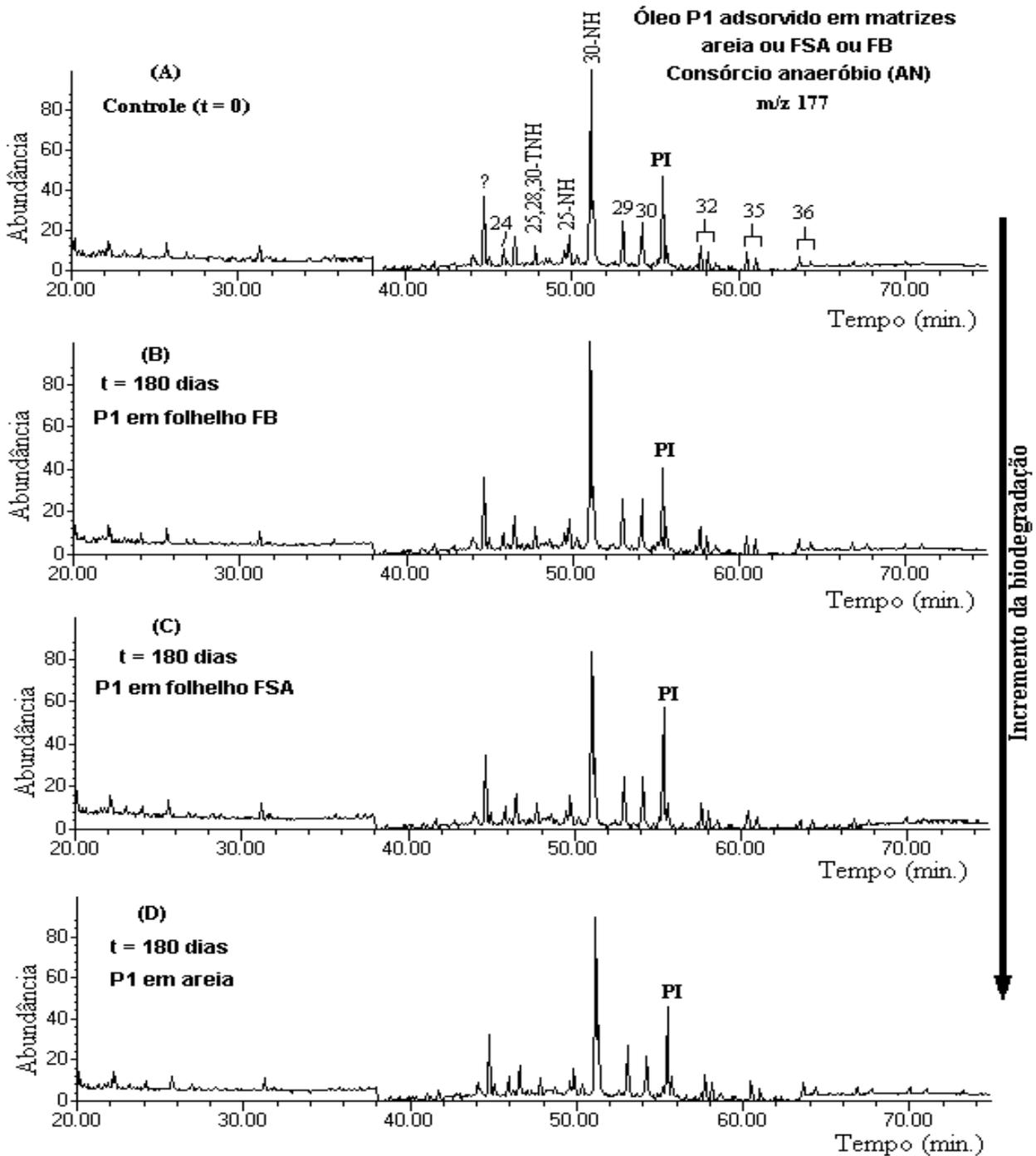


Figura 82. SIM m/z 177 para P1 adsorvido em **(B)** FB, **(C)** FSA e **(D)** areia com consórcio anaeróbico em 180 dias. 25,28,30-TNH = $17\alpha(H),18\alpha(H),21\beta(H)$ -25,28,30-trisnorhopano; 25-NH = $17\alpha(H),21\beta(H)$ -25-norhopano; 30-NH = $17\alpha(H),21\beta(H)$ -30-norhopano; PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

Tabela 37. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para a série de norhopanos detectados através do SIM m/z 191 e m/z 177 com P1 adsorvido em matrizes utilizando condições anaeróbias

Pico	Compostos	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%)*							
		Controle	P1 em areia		P1 em FSA		P1 em FB		
		0	90	180	90	180	90	180	
- ^a	25,28,30-TNH	3,7 \pm 2,3	3,4 / 8 \pm 1,2	2,8 / 24 \pm 0,9	3,5 / 5 \pm 1,2	3,0 / 19 \pm 0,9	3,6 / 3 \pm 1,2	3,3 / 11 \pm 0,9	
26 ^b	28,30-BNH	4,6 \pm 1,7	4,2 / 9 \pm 3,1	3,2 / 30 \pm 3,8	4,4 / 4 \pm 2,2	3,5 / 24 \pm 1,7	4,4 / 4 \pm 1,4	4,0 / 13 \pm 2,5	
27 ^c	25-NH	3,8 \pm 1,9	3,2 / 16 \pm 2,2	2,6 / 32 \pm 1,7	3,4 / 11 \pm 1,9	2,9 / 24 \pm 1,9	3,6 / 5 \pm 3,8	3,2 / 16 \pm 3,1	
28 ^d	30-NH	70,2 \pm 2,2	65,5 / 7 \pm 2,2	39,9 / 43 \pm 1,4	66,5 / 5 \pm 1,4	47,2 / 33 \pm 1,9	68,4 / 3 \pm 1,9	55,0 / 22 \pm 1,4	
29 ^e	Normoretano	4,0 \pm 1,4	3,6 / 10 \pm 1,9	2,7 / 33 \pm 1,7	3,7 / 8 \pm 2,0	3,0 / 25 \pm 1,7	3,7 / 8 \pm 2,7	3,4 / 15 \pm 1,7	

^a17 α (H),18 α (H),21 β (H)-25,28,30-trisnorhopano em m/z 177 (Figuras 45 e 46); ^b17 α (H),18 α (H),21 β (H)-28,30-bisnorhopano em m/z 191 (Figuras 38 e 39);

^c17 α (H),21 β (H)-25-norhopano em m/z 191 e 177; ^d17 α (H),21 β (H)-30-norhopano em m/z 191 e 177; ^e17 β (H),21 α (H)-normoretano em m/z 191 e 177.

3.2.2.2.4 Esteranos Regulares

A **Figura 83** mostra o incremento da biodegradação para esteranos regulares e diasteranos monitorados através do SIM m/z 217 e a **Tabela 38** contém a concentração e as taxas de biodegradação para estes compostos utilizando condições anaeróbias e P1 adsorvido em diferentes matrizes.

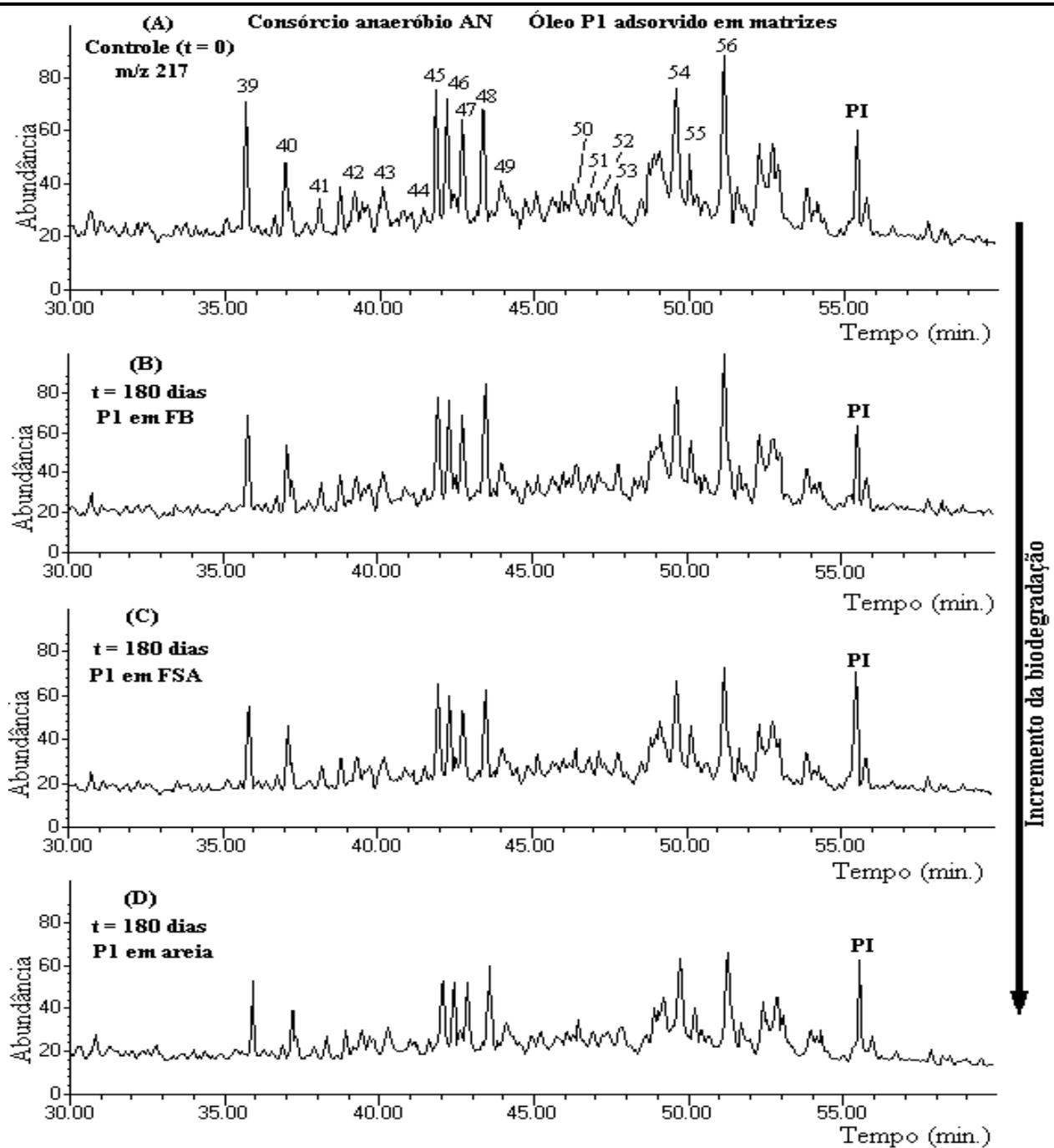


Figura 83. SIM m/z 217 para P1 adsorvido em (B) FB, (C) FSA e (D) areia, mostrando o incremento da biodegradação de esteranos e diasteranos com consórcio anaeróbico em 180 dias. PI = Padrão Interno (5α -colestano-3-ona).

Tabela 38. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e taxa de biodegradação (TB %) para esteranos em m/z 217 com P1 adsorvido em diferentes matrizes em condições anaeróbias

Pico	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%)*						
	Controle	P1 em areia		P1 em FSA		P1 em FB	
	0	90	180	90	180	90	180
39	36,4 \pm 1,0	23,5 / 35 \pm 2,2	22,3 / 39 \pm 1,1	23,9 / 34 \pm 2,2	22,7 / 38 \pm 1,1	26,8 / 26 \pm 2,8	23,3 / 36 \pm 3,0
40	13,8 \pm 2,7	8,7 / 37 \pm 1,5	8,0 / 42 \pm 1,6	8,9 / 36 \pm 1,5	8,2 / 41 \pm 1,6	9,3 / 33 \pm 1,0	8,8 / 36 \pm 2,01
41	5,8 \pm 3,0	3,4 / 41 \pm 0,4	2,9 / 50 \pm 2,8	3,6 / 38 \pm 0,4	3,1 / 47 \pm 2,8	4,3 / 26 \pm 1,9	3,7 / 36 \pm 1,2
42	4,9 \pm 3,2	2,8 / 43 \pm 1,1	2,5 / 49 \pm 2,2	2,9 / 41 \pm 1,1	2,7 / 45 \pm 2,2	3,9 / 20 \pm 2,1	3,2 / 35 \pm 2,1
43	4,6 \pm 0,8	3,2 / 30 \pm 1,6	2,8 / 39 \pm 1,2	3,0 / 35 \pm 1,6	2,9 / 37 \pm 1,2	3,6 / 22 \pm 2,8	3,0 / 35 \pm 1,9
44	2,5 \pm 2,5	2,1 / 16 \pm 0,5	1,7 / 32 \pm 1,5	1,9 / 24 \pm 0,9	1,6 / 36 \pm 1,7	2,0 / 20 \pm 0,5	1,7 / 32 \pm 1,5
45	34,2 \pm 2,6	14,4 / 58 \pm 2,2	10,4 / 70 \pm 1,7	15,3 / 55 \pm 2,0	11,6 / 66 \pm 1,4	15,8 / 54 \pm 2,2	11,9 / 65 \pm 1,7
46	35,1 \pm 2,1	15,2 / 57 \pm 1,0	9,5 / 73 \pm 0,6	16,2 / 54 \pm 2,4	11,3 / 68 \pm 1,2	16,9 / 52 \pm 1,0	12,2 / 65 \pm 0,6
47	22,1 \pm 2,4	10,9 / 51 \pm 0,7	5,8 / 74 \pm 2,1	13,2 / 40 \pm 2,5	7,0 / 68 \pm 1,5	13,8 / 38 \pm 0,7	7,6 / 66 \pm 2,1
48	24,6 \pm 2,4	9,8 / 60 \pm 1,0	4,4 / 82 \pm 1,5	13,0 / 47 \pm 2,2	7,1 / 71 \pm 0,9	13,6 / 45 \pm 1,0	7,7 / 69 \pm 1,5
49	4,5 \pm 1,6	3,8 / 16 \pm 1,4	3,1 / 31 \pm 1,1	3,8 / 16 \pm 1,3	3,0 / 33 \pm 2,2	4,2 / 7 \pm 1,4	3,6 / 20 \pm 1,1
50	3,3 \pm 2,7	1,7 / 48 \pm 1,2	1,2 / 64 \pm 1,5	2,1 / 36 \pm 1,5	1,3 / 60 \pm 0,9	2,7 / 18 \pm 1,2	1,9 / 42 \pm 1,5
51	2,1 \pm 1,5	0,9 / 57 \pm 1,5	0,7 / 67 \pm 0,7	1,1 / 48 \pm 2,1	0,8 / 61 \pm 1,1	1,7 / 19 \pm 1,5	1,1 / 48 \pm 0,7
52	2,4 \pm 2,0	1,0 / 58 \pm 0,6	0,8 / 67 \pm 1,2	1,2 / 50 \pm 1,6	0,9 / 63 \pm 0,8	1,6 / 33 \pm 0,6	1,3 / 46 \pm 1,2
53	3,6 \pm 1,7	1,6 / 56 \pm 1,2	1,1 / 69 \pm 1,5	1,8 / 50 \pm 1,3	1,2 / 64 \pm 1,2	2,1 / 42 \pm 1,2	1,6 / 56 \pm 1,5
54	33,8 \pm 1,9	18,0 / 47 \pm 1,4	15,8 / 53 \pm 2,0	19,9 / 41 \pm 3,7	17,7 / 48 \pm 1,9	20,5 / 39 \pm 1,4	20,8 / 38 \pm 2,0
55	4,0 \pm 2,2	2,3 / 43 \pm 1,2	1,8 / 55 \pm 2,1	2,9 / 28 \pm 1,8	2,0 / 50 \pm 1,4	3,3 / 18 \pm 1,2	2,5 / 38 \pm 2,1
56	36,1 \pm 1,0	24,4 / 32 \pm 1,1	15,2 / 58 \pm 1,0	27,2 / 25 \pm 3,1	17,5 / 52 \pm 1,2	27,6 / 24 \pm 1,1	21,6 / 40 \pm 1,0

*Média de duplicata, desvio padrão (n=2).

O consórcio anaeróbio com P1 adsorvido em matrizes apresentou o mesmo comportamento observado para os esteranos no experimento que utiliza P1 disperso no meio, porém com maior taxa de biodegradação. Aqui também os esteranos foram mais biodegradados que os hopanos com a mesma ordem de preferência já relatada: $\alpha\alpha\alpha$ 20R >> $\alpha\beta\beta$ 20R + $\alpha\beta\beta$ 20S \geq $\alpha\alpha\alpha$ 20S >> diasteranos, com degradação seletiva de $C_{27} > C_{28} > C_{29}$ [Tabela 38]. Mais uma vez, com a remoção preferencial de esteranos relativa aos hopanos, a razão esterano/hopano diminuiu com o aumento da biodegradação [Tabela 44, pág. 219].

Após análise das taxas de biodegradação e de todos os parâmetros estudados e considerando as condições anaeróbias utilizadas nestes experimentos foi possível sugerir a seguinte preferência de biodegradação para os anaeróbios: hidrocarbonetos > esteranos > hopanos e homohopanos > 25-norhopanos > terpanos tricíclicos. Vale ressaltar que a microbiota responsável pela biodegradação do petróleo em condições de anaerobiose foram identificadas como bactérias anaeróbias facultativas pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Acinetobacter* [Figura 11, pág. 42]. O gênero *Bacillus* também está presente no consórcio aeróbio, em menor proporção, porém em condições anaeróbias estas bactérias degradam o petróleo pelo uso de sulfatos, como aceptor de elétrons, via redução desassimilatória de sulfato (Thauer *et al.*, 1977; Oude Elferink *et al.*, 1994), além disso, elas possuem a capacidade de produzir endosporos resistentes ao calor, quando submetidas a temperaturas elevadas (Pettersen *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 2000), como nos ensaios em condições anaeróbias realizados neste trabalho.

3.2.3 BIODEGRADAÇÃO MISTA (Co1AN e Co2AN)

A maioria dos estudos sobre biodegradação de petróleos utiliza os consórcios separadamente nos experimentos, entretanto, baseado em evidências científicas encontradas em pesquisas desenvolvidas por nosso grupo, acredita-se na hipótese de

que o processo de biodegradação nos reservatórios pode resultar da ação de ambos os consórcios (Da Cruz *et al.*, 2008), ou seja, os microrganismos aeróbios e anaeróbios seriam responsáveis pela biodegradação do petróleo através de ação sinérgica entre eles. Para isso, assume-se que o oxigênio produzido durante o processo de biodegradação seja armazenado em biofilmes na interface óleo-água. Na tentativa de confirmar tal hipótese, fez-se a medida da quantidade de oxigênio dissolvido (OD) presente em solução para todos os experimentos realizados. A quantidade de oxigênio dissolvido foi medida utilizando-se um equipamento portátil modelo AP84 *Fisher Scientific* com probes individuais para medidas de pH, oxigênio e temperatura. A **Figura 84** mostra estes resultados.

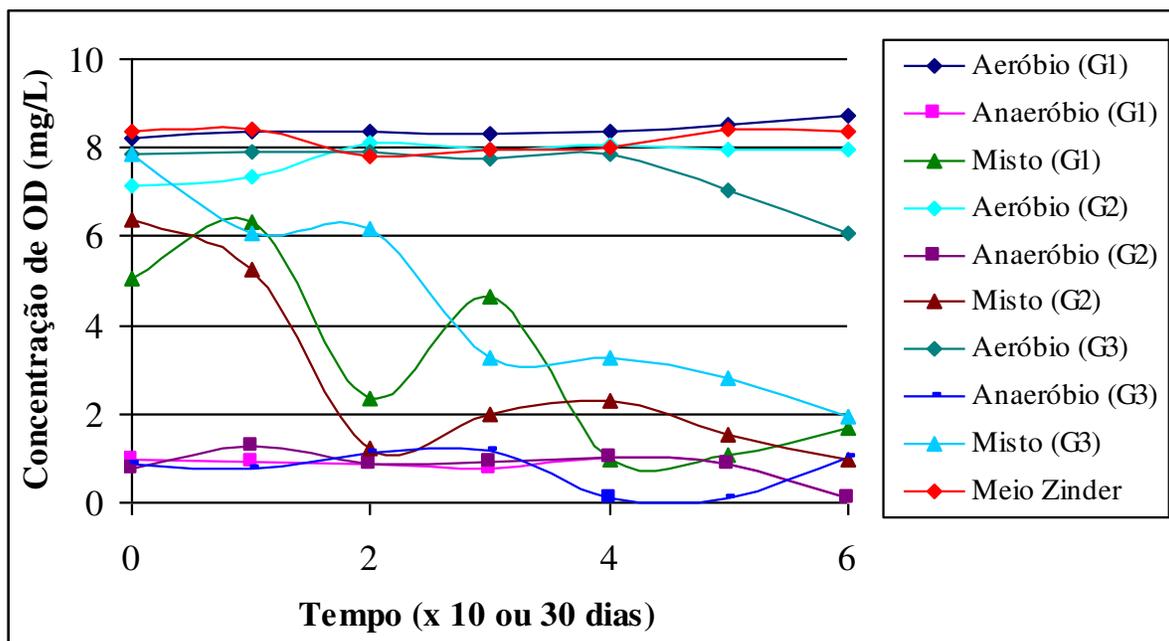


Figura 84. Quantidade de oxigênio dissolvido para os consórcios estudados com destaque para os consórcios mistos mostrando a oscilação ao longo do tempo. Tempo: 1= 10 ou 30; 2 = 20 ou 60; 3 = 30 ou 90; 4 = 40 ou 120; 5 = 50 ou 150; 6 = 60 ou 180 dias. Grupos G1, G2 e G3 representam os ensaios com P1 disperso no meio, adsorvido em areia e em folhelho, respectivamente.

A quantidade de oxigênio dissolvido em solução variou de 6,06 a 8,78 mg/L \pm 1,18 para os consórcios aeróbios, de 0,08 a 1,28 mg/L \pm 0,62 para o consórcio anaeróbio e de 0,59 a 7,85 mg/L \pm 1,08 para os consórcios mistos. Observa-se que existem pontos de alto e baixo teor de oxigênio nos ensaios com consórcios mistos, o que pode mais uma vez caracterizar a ação de ambos os consórcios durante o processo de biodegradação.

Sabe-se que BRS Gram-negativas dos gêneros *Desulfomicrobium* e *Desulfovibrio* conseguem sobreviver em estresse de oxigênio (Bade *et al.*, 2000). Algumas dessas espécies já foram isoladas de ambientes óxico/anóxico indicando a resistência das mesmas a períodos intermitentes de exposição ou não ao oxigênio (Sass, *et al.*, 1997; Bade *et al.*, 2000). Por outro lado existem espécies de BRS que são altamente sensíveis ao oxigênio (Bade *et al.*, 2000). Estas observações indicam, mais uma vez, que as características fisiológicas ou funções ecológicas das bactérias presentes em um consórcio mudam de acordo com as condições ambientais ao qual o consórcio é submetido e mostra também a possibilidade de coexistência entre microrganismos aeróbios e anaeróbios. Além disso, existem relatos da existência de bactérias não degradadoras de hidrocarbonetos, mas que são tolerantes às condições de altas pressões, temperaturas e salinidade dos reservatórios de petróleo, podendo sobreviver neste ambiente à custa dos produtos do metabolismo de outras bactérias presentes (Bergey, 2001), ratificando a existência de cometabolismo entre consórcios de diferentes microrganismos, como sugerido neste trabalho. É importante considerar que este é o primeiro relato sobre biodegradação de petróleo utilizando consórcios mistos obtidos diretamente de enriquecimentos de amostras de petróleo e água de formação.

A biodegradação foi realizada com os consórcios Co1AN e Co2AN utilizando P1 disperso no meio e adsorvido nas matrizes areia e folhelhos. Após análise dos resultados notou-se que ambos os consórcios mistos se comportam de maneira muito semelhante (com variação inferior a 1 % nas taxas de biodegradação) independente de

como o petróleo foi utilizado no ensaio, com isso, resolveu-se mostrar os resultados obtidos apenas para um dos experimentos representativo para os demais.

3.2.3.1 *n*-Alcanos e Isoprenóides

O processo de biodegradação dos consórcios mistos foi monitorado durante 180 dias revelando que o mesmo oscilava (independente se o petróleo se encontrava adsorvido em matriz ou não) ora apresentando características de biodegradação aeróbia (com degradação preferencial de *n*-alcanos com número par de carbonos) ora com características da microbiota anaeróbia (com degradação preferencial de *n*-alcanos com número ímpar de carbonos). A **Figura 85** ilustra estes resultados com P1 adicionado direto ao meio, representativo para todos os ensaios.

Da mesma forma que os ensaios em aerobiose e anaerobiose, as razões $P/n-C_{17}$ e $F/n-C_{18}$ aumentaram e a razão P/F diminuiu com o progresso da biodegradação [**Tabela 43, pág. 213**].

As taxas de biodegradação para Co1AN com P1 disperso no meio estão na **Tabela 39**.

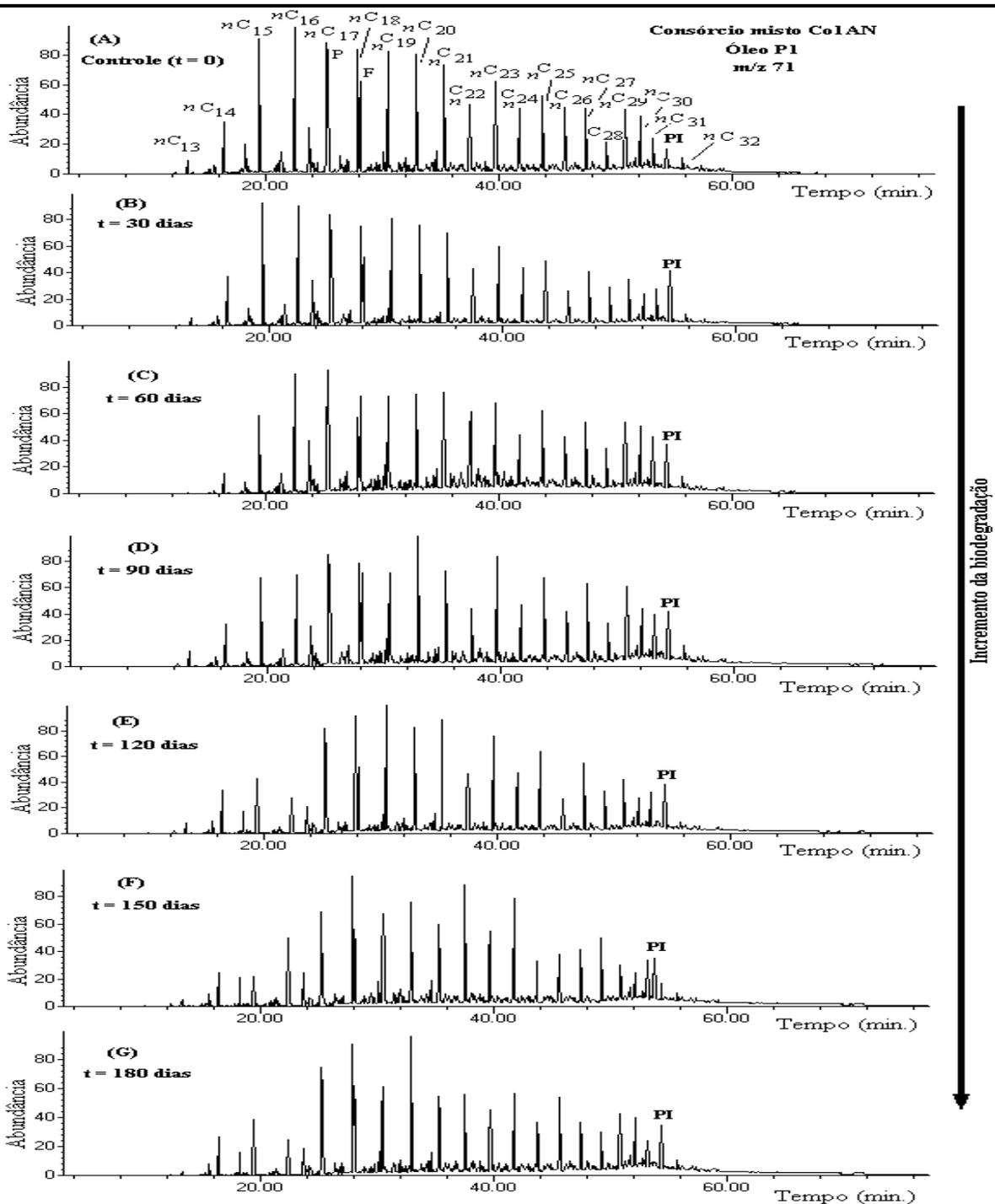


Figura 85. RIC m/z 71 mostrando o incremento da biodegradação de PI disperso no meio com consórcio misto. nC_{13} - nC_{32} = n -alcanos; P = Pristano; F = Fitano; PI = Padrão Interno (5 α -colestano-3-ona).

Tabela 39. Taxas de biodegradação (%) para *n*-alcanos e isoprenóides utilizando P1 disperso no meio com consórcio misto

Pico	Composto	Fórmula	MM ^a	Taxas de biodegradação (%) ^b /Tempo (dias)					
				30	60	90	120	150	180
<i>n</i> C ₁₃	<i>n</i> -Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	184	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>n</i> C ₁₄	<i>n</i> -Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀	198	8 ± 1,6	12 ± 2,1	19 ± 1,2	26 ± 1,8	34 ± 1,2	48 ± 1,6
<i>n</i> C ₁₅	<i>n</i> -Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	212	7 ± 0,8	9 ± 1,1	16 ± 2,2	33 ± 2,6	44 ± 1,0	51 ± 1,4
<i>n</i> C ₁₆	<i>n</i> -Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	226	16 ± 1,5	18 ± 0,8	22 ± 1,2	24 ± 3,0	29 ± 2,0	33 ± 1,1
<i>n</i> C ₁₇	<i>n</i> -Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	240	7 ± 1,0	19 ± 1,3	21 ± 1,6	28 ± 1,0	43 ± 1,1	50 ± 0,8
P	Pristano	C ₁₉ H ₄₀	268	5 ± 2,1	15 ± 1,0	18 ± 2,1	22 ± 0,9	38 ± 1,2	46 ± 0,6
<i>n</i> C ₁₈	<i>n</i> -Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	254	11 ± 1,2	22 ± 0,9	23 ± 0,8	25 ± 0,9	38 ± 1,1	42 ± 2,8
F	Fitano	C ₂₀ H ₄₂	282	4 ± 0,8	13 ± 1,4	16 ± 2,0	19 ± 0,9	32 ± 0,9	39 ± 1,8
<i>n</i> C ₁₉	<i>n</i> -Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	268	8 ± 0,7	15 ± 1,5	25 ± 2,0	48 ± 1,2	54 ± 1,5	57 ± 0,9
<i>n</i> C ₂₀	<i>n</i> -Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	282	11 ± 1,0	24 ± 2,2	33 ± 1,3	35 ± 2,0	38 ± 1,6	42 ± 1,2
<i>n</i> C ₂₁	<i>n</i> -Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	296	9 ± 0,8	17 ± 2,3	26 ± 1,1	46 ± 0,9	56 ± 1,6	62 ± 1,8
<i>n</i> C ₂₂	<i>n</i> -Docosano	C ₂₂ H ₄₆	310	21 ± 2,0	32 ± 1,9	38 ± 3,2	38 ± 1,1	40 ± 1,5	47 ± 0,7
<i>n</i> C ₂₃	<i>n</i> -Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	324	16 ± 3,0	28 ± 2,3	31 ± 1,1	45 ± 1,2	57 ± 1,1	60 ± 0,9
<i>n</i> C ₂₄	<i>n</i> -Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	338	20 ± 2,7	24 ± 1,2	48 ± 2,2	48 ± 1,2	50 ± 1,0	51 ± 1,5
<i>n</i> C ₂₅	<i>n</i> -Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	352	13 ± 1,1	19 ± 1,8	26 ± 1,5	39 ± 0,7	56 ± 0,9	59 ± 1,6
<i>n</i> C ₂₆	<i>n</i> -Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	366	17 ± 0,6	29 ± 1,0	38 ± 1,4	39 ± 1,4	41 ± 1,2	44 ± 0,9
<i>n</i> C ₂₇	<i>n</i> -Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	380	14 ± 1,0	18 ± 0,7	20 ± 0,9	41 ± 0,6	47 ± 1,7	64 ± 1,8
<i>n</i> C ₂₈	<i>n</i> -Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	394	25 ± 1,0	29 ± 1,6	32 ± 2,5	34 ± 0,9	39 ± 1,8	41 ± 2,0
<i>n</i> C ₂₉	<i>n</i> -Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	408	4 ± 1,9	6 ± 1,8	23 ± 1,1	46 ± 1,1	58 ± 1,6	67 ± 1,0
<i>n</i> C ₃₀	<i>n</i> -Triacontano	C ₃₀ H ₆₂	422	16 ± 0,8	32 ± 2,4	37 ± 2,0	39 ± 1,0	41 ± 1,2	42 ± 1,3
<i>n</i> C ₃₁	<i>n</i> -Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	436	14 ± 2,6	25 ± 1,5	27 ± 1,8	36 ± 0,6	49 ± 2,1	59 ± 1,9
<i>n</i> C ₃₂	<i>n</i> -Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆	450	24 ± 2,6	36 ± 1,3	39 ± 2,2	39 ± 1,0	40 ± 1,0	42 ± 1,8

^aMM = Massa Molecular; ^bMédia de duplicata, desvio padrão (n=2).

3.2.3.2 Sesquiterpanos Bicíclicos

O consórcio misto degradou preferencialmente os sesquiterpanos bicíclicos com esqueleto tipo drimano, seguido dos homodrimanos.

A **Figura 86** mostra o cromatograma de íons extraídos para m/z 123 com consórcio misto e P1 disperso no meio.

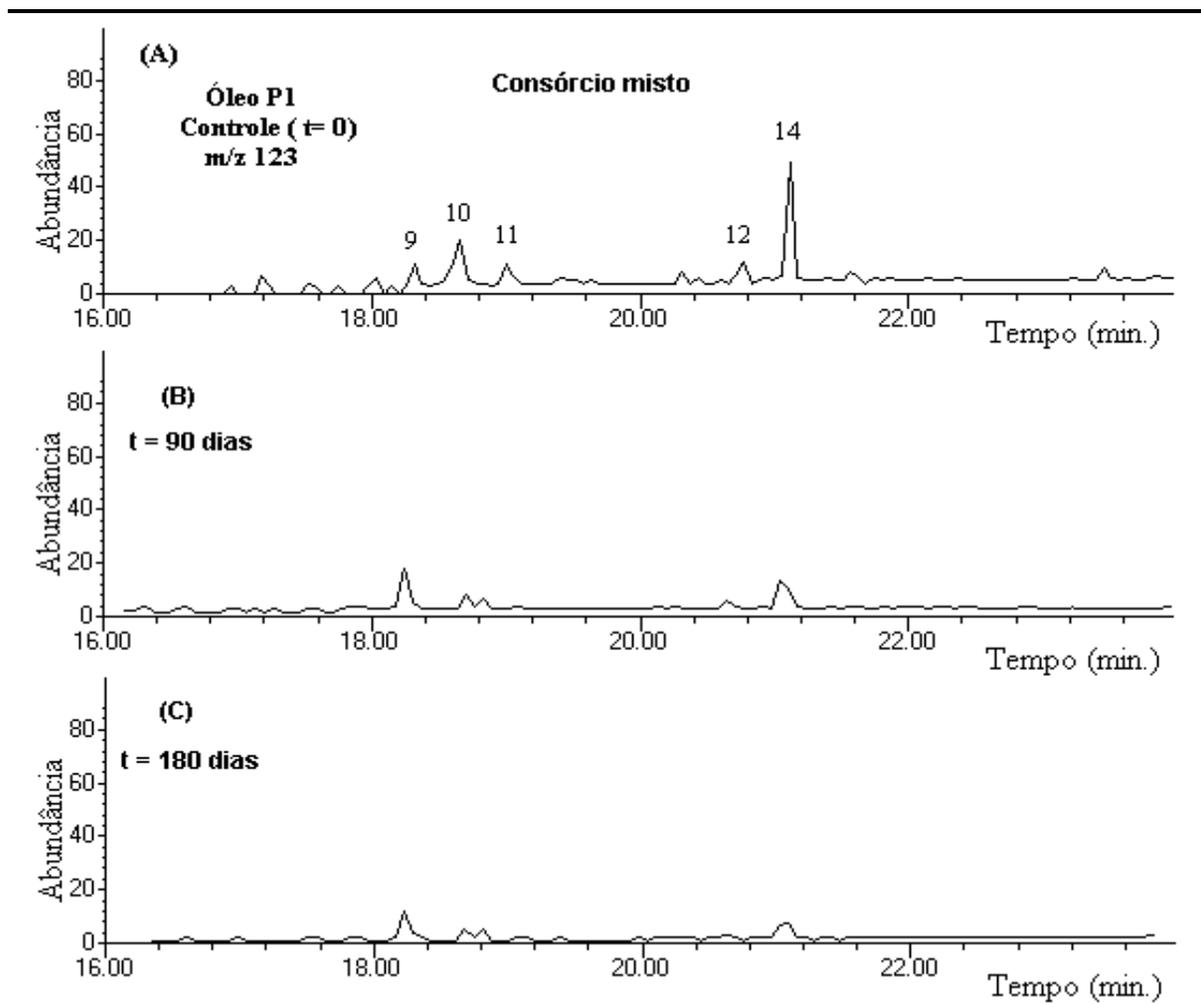


Figura 86. Sesquiterpanos bicíclicos monitorados através do íon m/z 123 no ensaio com P1 disperso no meio e o consórcio misto (B) 90 e (C) 180 dias.

3.2.3.3 Terpanos Tricíclicos, Tetracíclicos e Pentacíclicos

Quando se fez a análise para terpanos tricíclicos e pentacíclicos notou-se que de 30 a 90 dias a biodegradação é semelhante ao observado para os experimentos em condições aeróbias e de 120 até o término do experimento observa-se características de biodegradação anaeróbia, ou seja, até 90 dias observa-se que os hopanos (**picos 30-38**, *Figura 87 e Tabela 40*) são preferencialmente biodegradados quando comparado aos terpanos tricíclicos (**picos 16-18, 20-22 e 25**, *Figura 87 e Tabela 40*), como observado nos experimentos em condições aeróbias e, após este período, esta tendência é invertida, mostrando uma leve preferência pelos terpanos tricíclicos, como visto nos experimentos em condições anaeróbias. Isto também foi observado pelos parâmetros obtidos para este ensaio [**Tabela 43**, *pág. 213*], onde se tem, por exemplo, índice crescente de C_{28} e C_{29} TT no período de 30 a 90 dias, característico da microbiota aeróbia e decrescente de 90 a 120 dias, característico da microbiota anaeróbia. Esta oscilação entre aerobiose e anaerobiose é observada para todos os parâmetros calculados e é condizente com a hipótese sugerida neste trabalho. Para os homohopanos houve uma degradação não usual com preferência dos epímeros $22R$ e $C_{33} > C_{32} > C_{31} > C_{34} > C_{35}$, mostrando que o C_{35} também é mais resistente a biodegradação com os consórcios mistos assim como foi visto para os anaeróbios.

Estes resultados podem ser observados pela **Figura 87 e Tabela 40** que apresentam os cromatogramas obtidos para os terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos através do SIM para o íon-fragmento m/z 191, as concentrações ($\mu\text{g/g}$ F1) e as taxas de biodegradação, respectivamente, com o consórcio misto para P1 disperso no meio, representativo para todos os experimentos.

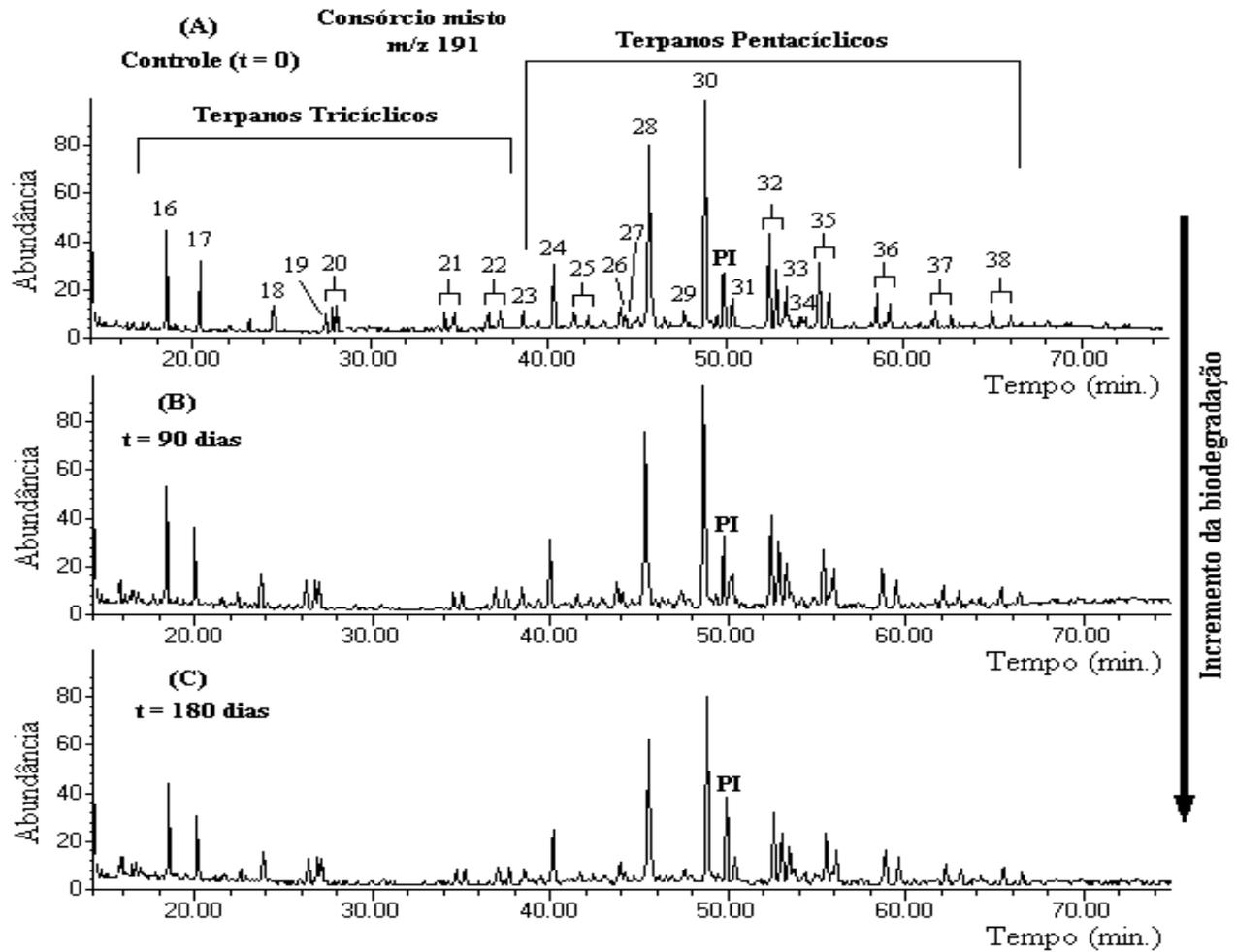


Figura 87. SIM m/z 191 monitorando a biodegradação pelo consórcio misto com PI disperso no meio em (B) 90 e (C) 180 dias. PI = Padrão Interno (5α -colestan-3-ona).

Tabela 40. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos em m/z 191 com consórcio misto e P1 disperso no meio

Pico	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%)*						
	Tempo (dias)						
	0	30	60	90	120	150	180
16	33,0 \pm 3,0	29,3 / 11 \pm 2,5	29,0 / 12 \pm 2,7	28,9 / 12 \pm 1,2	26,7 / 19 \pm 2,6	25,8 / 22 \pm 1,1	20,7 / 37 \pm 1,8
17	16,5 \pm 1,0	14,6 / 12 \pm 1,5	14,5 / 12 \pm 1,5	14,3 / 13 \pm 2,5	11,5 / 30 \pm 3,2	10,7 / 35 \pm 2,4	10,2 / 38 \pm 3,4
18	5,9 \pm 2,7	5,3 / 10 \pm 1,8	5,2 / 12 \pm 3,6	5,2 / 12 \pm 2,0	4,4 / 25 \pm 1,0	4,2 / 29 \pm 2,9	3,8 / 36 \pm 1,5
19	4,8 \pm 3,8	4,7 / 2 \pm 2,9	4,6 / 4 \pm 1,9	4,4 / 8 \pm 1,9	3,4 / 29 \pm 1,1	3,3 / 31 \pm 1,4	2,8 / 42 \pm 1,4
20S	6,0 \pm 3,2	5,9 / 2 \pm 0,0	5,8 / 3 \pm 1,7	5,6 / 7 \pm 2,4	4,5 / 25 \pm 1,8	4,2 / 30 \pm 3,1	4,0 / 33 \pm 3,8
20R	6,1 \pm 0,8	5,9 / 3 \pm 1,8	5,8 / 5 \pm 2,6	5,7 / 7 \pm 2,7	4,3 / 30 \pm 2,0	4,1 / 33 \pm 1,9	3,7 / 39 \pm 2,0
21S	5,3 \pm 2,1	5,1 / 4 \pm 1,9	5,0 / 7 \pm 1,5	4,7 / 11 \pm 1,4	4,4 / 17 \pm 1,6	4,0 / 26 \pm 1,5	3,8 / 28 \pm 2,3
21R	5,9 \pm 2,6	5,4 / 8 \pm 1,9	5,1 / 14 \pm 2,5	4,9 / 17 \pm 1,2	3,9 / 34 \pm 3,1	3,6 / 39 \pm 2,3	3,3 / 44 \pm 3,1
22S	4,9 \pm 2,4	4,6 / 6 \pm 1,4	4,4 / 10 \pm 1,8	4,2 / 14 \pm 2,3	3,8 / 22 \pm 1,7	3,6 / 27 \pm 2,4	3,0 / 38 \pm 1,2
22R	5,2 \pm 2,4	4,9 / 6 \pm 2,0	4,6 / 12 \pm 2,6	4,4 / 15 \pm 1,4	3,6 / 31 \pm 1,4	3,2 / 38 \pm 2,4	3,1 / 40 \pm 1,7
23	5,4 \pm 1,6	5,2 / 4 \pm 0,9	5,1 / 6 \pm 1,2	5,0 / 7 \pm 1,4	4,7 / 13 \pm 2,5	4,1 / 24 \pm 1,7	3,7 / 31 \pm 1,6
24	15,6 \pm 2,7	15,4 / 1 \pm 3,8	14,8 / 5 \pm 1,4	13,7 / 12 \pm 2,5	12,8 / 18 \pm 1,4	10,5 / 33 \pm 2,7	9,6 / 38 \pm 1,9
25S	4,5 \pm 2,0	4,4 / 2 \pm 3,1	4,3 / 4 \pm 2,2	4,1 / 9 \pm 1,9	3,8 / 16 \pm 1,9	3,6 / 20 \pm 1,7	3,3 / 27 \pm 2,3
25R	4,8 \pm 1,5	4,7 / 2 \pm 1,4	4,5 / 6 \pm 1,7	4,3 / 10 \pm 2,2	3,5 / 27 \pm 2,2	3,1 / 35 \pm 1,8	2,9 / 40 \pm 2,0
26	4,6 \pm 1,7	4,3 / 6 \pm 1,9	4,3 / 6 \pm 3,8	3,9 / 15 \pm 3,1	3,7 / 20 \pm 2,5	3,5 / 24 \pm 1,7	3,2 / 30 \pm 3,8
27	3,8 \pm 1,9	3,7 / 3 \pm 2,2	3,6 / 5 \pm 1,4	3,3 / 13 \pm 2,5	3,2 / 16 \pm 3,1	3,0 / 21 \pm 1,9	2,7 / 29 \pm 1,7
28	70,2 \pm 2,2	68,8 / 2 \pm 2,0	63,5 / 10 \pm 2,7	59,2 / 16 \pm 1,7	54,2 / 23 \pm 1,4	46,3 / 34 \pm 1,9	39,2 / 44 \pm 1,4

29	4,0 ± 1,4	3,9 / 3 ± 1,4	3,6 / 10 ± 1,9	3,4 / 15 ± 1,4	3,2 / 20 ± 1,7	3,0 / 25 ± 1,7	2,7 / 33 ± 1,7
30	120,0 ± 1,9	106,2 / 12 ± 3,1	98,4 / 18 ± 1,7	89,5 / 25 ± 1,9	89,0 / 26 ± 2,0	57,5 / 52 ± 1,4	50,1 / 58 ± 2,5
31	10,2 ± 1,4	10,1 / 1 ± 2,2	8,9 / 13 ± 1,5	7,3 / 28 ± 2,0	7,1 / 30 ± 1,9	7,0 / 31 ± 3,8	6,9 / 32 ± 2,7
32S	34,2 ± 2,5	28,6 / 16 ± 1,9	26,3 / 23 ± 1,9	24,2 / 29 ± 2,2	23,8 / 30 ± 1,7	22,9 / 33 ± 0,9	22,2 / 35 ± 1,5
32R	13,9 ± 1,7	11,5 / 17 ± 1,4	10,3 / 26 ± 2,7	9,2 / 34 ± 1,7	9,3 / 33 ± 2,2	8,9 / 36 ± 1,5	8,6 / 38 ± 2,0
33	12,8 ± 1,4	11,8 / 8 ± 1,5	9,6 / 25 ± 0,2	8,1 / 37 ± 0,9	7,8 / 39 ± 1,7	7,4 / 42 ± 2,2	7,1 / 45 ± 4,0
34	3,8 ± 2,2	3,4 / 11 ± 2,6	2,8 / 26 ± 2,0	2,3 / 39 ± 0,9	2,1 / 45 ± 0,9	2,0 / 47 ± 2,0	1,9 / 50 ± 1,5
35S	15,2 ± 1,0	12,1 / 20 ± 0,8	11,4 / 25 ± 1,2	10,1 / 34 ± 3,4	9,8 / 36 ± 0,9	9,6 / 37 ± 0,9	8,9 / 41 ± 2,2
35R	12,7 ± 1,1	10,2 / 20 ± 2,0	9,6 / 24 ± 3,2	8,8 / 31 ± 0,9	8,0 / 37 ± 3,4	7,8 / 39 ± 0,8	7,1 / 44 ± 1,3
36S	12,6 ± 2,2	9,8 / 22 ± 2,1	9,4 / 25 ± 1,0	7,9 / 37 ± 0,1	7,3 / 42 ± 1,6	7,0 / 44 ± 5,0	6,9 / 45 ± 4,3
36R	6,2 ± 1,8	4,8 / 23 ± 2,3	4,6 / 26 ± 2,4	3,8 / 39 ± 6,1	3,5 / 44 ± 0,1	3,3 / 47 ± 2,2	3,1 / 50 ± 3,1
37S	4,8 ± 1,3	4,1 / 15 ± 4,1	3,8 / 21 ± 3,2	3,5 / 27 ± 0,9	3,4 / 29 ± 2,1	3,2 / 33 ± 1,1	3,2 / 33 ± 1,4
37R	3,2 ± 1,4	2,6 / 19 ± 1,5	2,4 / 25 ± 2,2	2,2 / 31 ± 1,8	2,1 / 34 ± 1,4	2,0 / 38 ± 3,1	1,9 / 41 ± 1,5
38S	4,1 ± 3,1	3,6 / 12 ± 1,1	3,3 / 20 ± 0,9	3,1 / 24 ± 2,0	3,0 / 27 ± 3,1	2,8 / 32 ± 1,8	2,8 / 32 ± 1,5
38R	2,8 ± 0,9	2,3 / 18 ± 0,4	2,1 / 25 ± 0,2	2,0 / 29 ± 1,0	2,0 / 29 ± 1,3	1,9 / 32 ± 2,4	1,8 / 36 ± 1,5

*Média de duplicata, desvio padrão (n=2).

Para a série de norhopanos, observou-se degradação seletiva assim como ocorreu nos ensaios em anaerobiose. A **Figura 88** mostra o incremento da biodegradação e a **Tabela 41** contém a concentração para a série de norhopanos monitorados através do SIM m/z 177 ilustrando estes resultados em 90 e 180 dias.

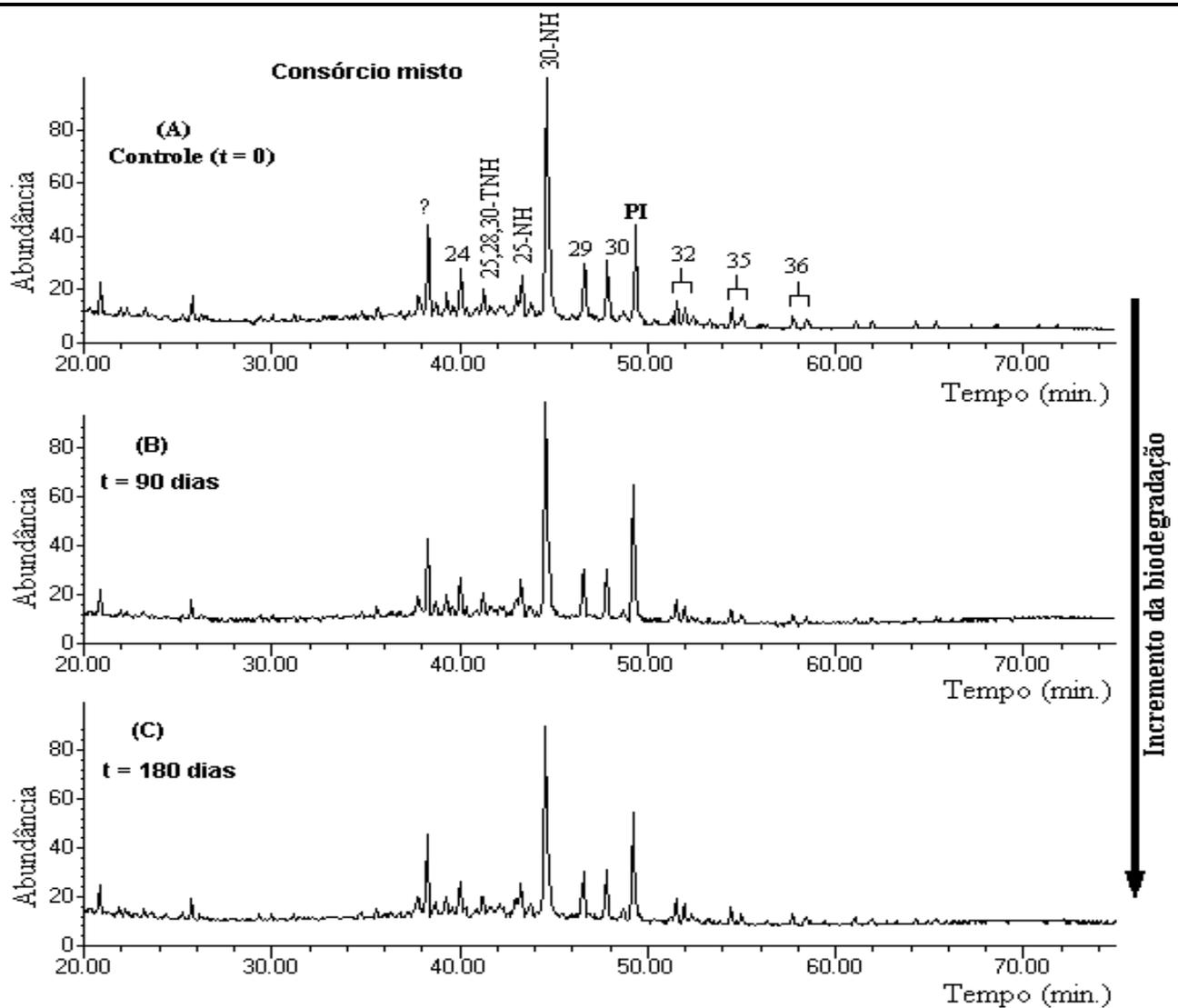


Figura 88. SIM m/z 177 para P1 disperso no meio com consórcio misto em (B) 90 e (C) 180 dias. 25,28,30-TNH = $17\alpha(H),18\alpha(H),21\beta(H)$ -25,28,30-trisnorhopano; 25-NH = $17\alpha(H),21\beta(H)$ -25-norhopano; 30-NH = $17\alpha(H),21\beta(H)$ -30-norhopano; PI = Padrão Interno (5α -coleston-3-ona).

Tabela 41. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para a série de norhopanos detectados através do SIM m/z 191 e m/z 177 com P1 disperso no meio utilizando condições mista de biodegradação

Pico	Compostos	Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) / TB (%)*		
		0	30	60
- ^a	17 α (H),18 α (H),21 β (H)- 25,28,30-trisnorhopano	3,7 \pm 2,3	3,5 / 5 \pm 1,6	3,0 / 19 \pm 1,0
26 ^b	17 α (H),18 α (H),21 β (H)- 28,30-bisnorhopano	4,6 \pm 1,7	3,9 / 15 \pm 2,1	3,2 / 30 \pm 1,8
27 ^c	17 α (H),21 β (H)-25-norhopano	3,8 \pm 1,9	3,3 / 13 \pm 2,5	2,7 / 29 \pm 1,7
28 ^d	17 α (H),21 β (H)-30-norhopano	70,2 \pm 2,2	59,2 / 16 \pm 1,7	39,2 / 44 \pm 1,4
29 ^e	17 β (H),21 α (H)-normoretano	4,0 \pm 1,4	3,4 / 15 \pm 1,4	2,7 / 33 \pm 1,7

^a17 α (H),18 α (H),21 β (H)-25,28,30-trisnorhopano em m/z 177 (Figuras 45 e 46); ^b17 α (H),18 α (H),21 β (H)-28,30-bisnorhopano em m/z 191 (Figuras 38 e 39); ^c17 α (H),21 β (H)-25-norhopano em m/z 191 e 177; ^d17 α (H),21 β (H)-30-norhopano em m/z 191 e 177; ^e17 β (H),21 α (H)-normoretano em m/z 191 e 177.

3.2.3.4 Esteranos Regulares

O consórcio misto degradou esteranos após remoção de hopanos (30 a 90 dias), semelhante aos aeróbios. Este resultado é consistente com o teor de oxigênio pois neste período predominam teores altos (4,35-6,06 mg/L, **Figura 84**, *pág. 188*) e portanto a microbiota aeróbia é favorecida. Por outro lado no período entre 120 e 180 dias predominam baixos teores de oxigênio (0,85-1,95 mg/L) favorecendo a microbiota anaeróbia facultativa que degrada esteranos antes dos hopanos semelhante aos experimentos de degradação anaeróbia. A seqüência de degradação dos esteranos, curiosamente, foi diferente da observada para os consórcios aeróbios e anaeróbios, com degradação preferencial dos isômeros com configuração geológica: $\alpha\beta\beta$ 20R + $\alpha\beta\beta$ 20S > $\alpha\alpha\alpha$ 20R > $\alpha\alpha\alpha$ 20S >> diasteranos, porém manteve a mesma degradação seletiva de C₂₇ > C₂₈ > C₂₉. É importante ressaltar que os isômeros com configuração

biológica $\alpha\alpha\alpha$ 20R são mais rapidamente consumidos ou biodegradados do que os outros isômeros em condições de reservatório (Rullkötter & Wendisch, 1982). Outra observação importante é que a suscetibilidade relativa de $\alpha\beta\beta$ 20R, $\alpha\beta\beta$ 20S e $\alpha\alpha\alpha$ 20S em simulações laboratoriais varia consideravelmente e depende do tipo de microrganismo envolvido e das condições utilizadas na simulação (Peters *et al.*, 2005).

Estes resultados foram obtidos após análise dos cromatogramas, concentrações e taxas de biodegradação obtidos para esteranos regulares e diasteranos analisados através do SIM m/z 217 na presença do consórcio misto que são mostrados na **Figura 89** e **Tabela 42**, respectivamente.

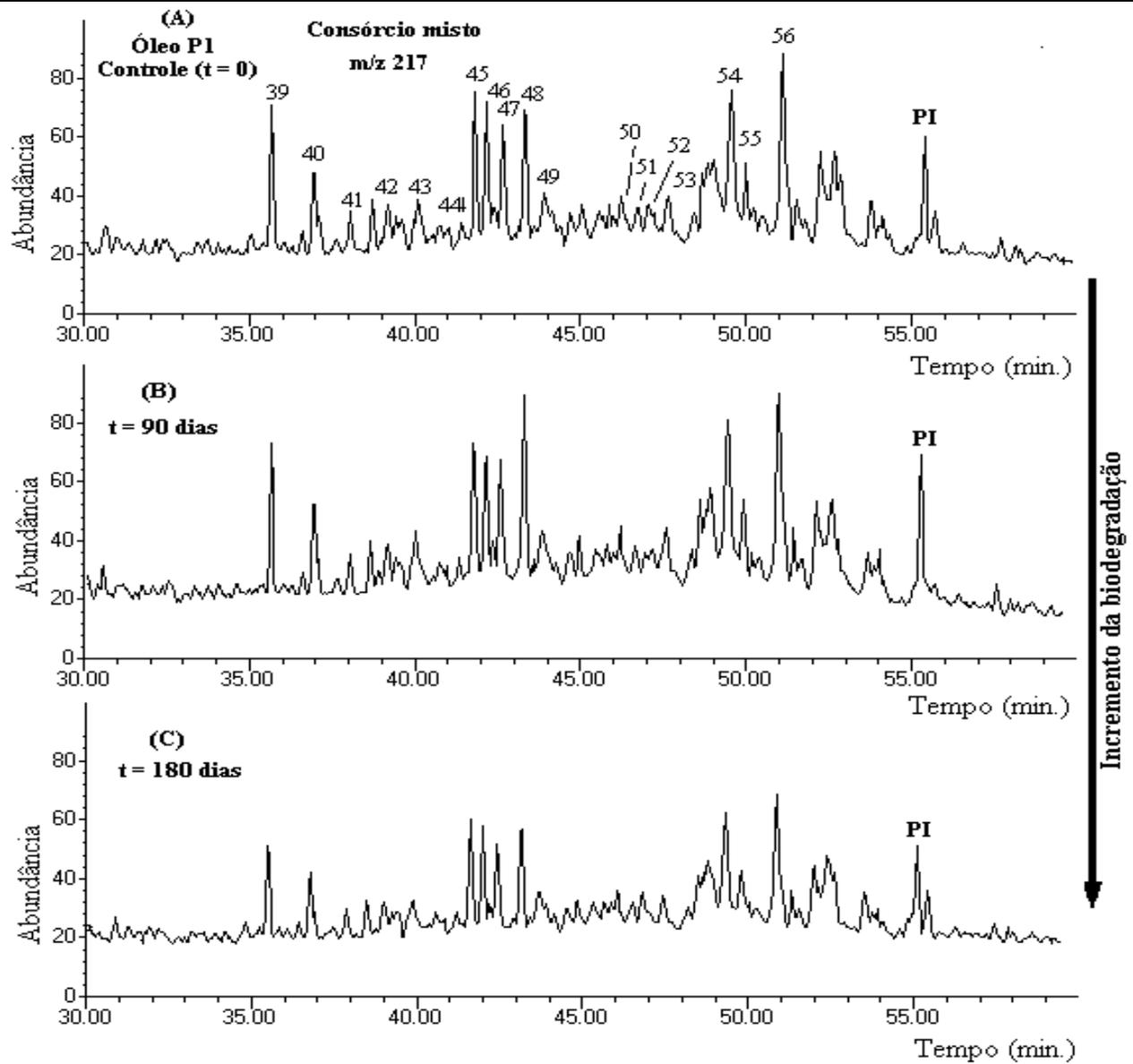


Figura 89. SIM m/z 217 para P1 disperso no meio mostrando o incremento da biodegradação de esteranos normais e diasteranos com consórcio misto.

Tabela 42. Concentração ($\mu\text{g/g}$ F1) e TB (%) para esteranos em m/z 217 com P1 disperso no meio para o consórcio misto

Pico	Concentração ($\mu\text{g/ g}$ F1) / Taxas de biodegradação (%)*		
	Tempo (dias)		
	0	90	180
39	36,4 \pm 1,0	30,8 / 15 \pm 2,2	29,1 / 20 \pm 3,2
40	13,8 \pm 2,7	11,8 / 14 \pm 1,5	11,1 / 20 \pm 2,5
41	5,8 \pm 3,0	4,7 / 19 \pm 0,4	4,5 / 22 \pm 1,4
42	4,9 \pm 3,2	4,1 / 16 \pm 1,1	3,9 / 20 \pm 1,1
43	4,6 \pm 0,8	4,0 / 13 \pm 1,6	3,8 / 17 \pm 2,6
44	2,5 \pm 2,5	2,2 / 12 \pm 0,5	2,1 / 16 \pm 1,5
45	34,2 \pm 2,6	25,8 / 25 \pm 2,2	22,3 / 35 \pm 3,2
46	35,1 \pm 2,1	22,6 / 36 \pm 1,0	18,0 / 49 \pm 1,0
47	22,1 \pm 2,4	14,3 / 35 \pm 0,7	11,0 / 50 \pm 1,7
48	24,6 \pm 2,4	18,2 / 26 \pm 1,0	15,0 / 39 \pm 1,0
49	4,5 \pm 1,6	4,0 / 11 \pm 1,4	3,8 / 16 \pm 1,4
50	3,3 \pm 2,7	2,5 / 24 \pm 1,2	2,2 / 33 \pm 1,8
51	2,1 \pm 1,5	1,4 / 33 \pm 1,5	1,1 / 48 \pm 1,5
52	2,4 \pm 2,0	1,6 / 33 \pm 0,6	1,3 / 46 \pm 1,6
53	3,6 \pm 1,7	2,7 / 25 \pm 1,2	2,3 / 36 \pm 1,2
54	33,8 \pm 1,9	26,1 / 23 \pm 1,4	24,8 / 27 \pm 2,4
55	4,0 \pm 2,2	2,9 / 28 \pm 1,2	2,3 / 43 \pm 1,8
56	36,1 \pm 1,0	27,2 / 25 \pm 1,1	25,9 / 28 \pm 1,5

Com a remoção preferencial de hopanos antes dos esteranos observou-se aumento na razão esterano/hopano até 90 dias e diminuição desta razão após este período, devido a remoção de esteranos antes dos hopanos [Tabela 44, *pág.* 219]. Este processo caracteriza mais uma vez a ação de ambos os consórcios no processo de biodegradação do petróleo.

Baseado nos resultados obtidos para o consórcio misto foi possível sugerir a ordem preferencial de degradação de hidrocarbonetos > hopanos > esteranos > 25-norhopanos > terpanos tricíclicos, até 90 dias de ensaio. De 120 a 180 dias observa-se uma inversão na ordem entre hopanos e esteranos. Outra consideração importante é que a análise da comunidade bacteriana mista [Figura 11, pág.42] presente após 120 dias de experimento confirmou a presença de microorganismos aeróbios (*Brevibacterium*, *Achromobacter* e *Bacillus*) e anaeróbios facultativos (*Bacillus*) pertencentes aos gêneros anteriormente identificados nos cultivos de aeróbios e anaeróbios, respectivamente, além da predominância de bactérias do gênero *Stenotrophomonas* (50 %) e 6 % de *Rhizobium*, as quais poderiam estar envolvidas diretamente na alteração observada para a ordem de degradação dos esteranos discutida neste tópico. Existem vários trabalhos na literatura que também identificaram bactérias do gênero *Stenotrophomonas* presentes em consórcios mistos que degradam diferentes hidrocarbonetos (Hawle-Ambrosch et al., 2007; Martín-Gil et al., 2008).

3.2.3.5 Análise da fração neutra insaturada

O estudo dos hidrocarbonetos aromáticos como indicadores geoquímicos é complexo devido à variedade destes compostos e seus padrões de fragmentação. A abundância e distribuição de HPAs em óleos e sedimentos fornecem importantes parâmetros de maturação e biodegradação (Tissot *et al.*, 1978). Estes compostos são menos suscetíveis a biodegradação do que os *n*-alcanos, isoprenóides e alcanos policíclicos (Tissot *et al.*, 1978). Óleos com biodegradação moderada não apresentam alquilbenzenos e têm concentração reduzida de naftalenos (Volkman *et al.*, 1984).

As principais classes de HCs aromáticos são: alquilbenzenos, alquilnaftalenos, alquilbifenilas, alquildifenilmetanos, alquilfenantrenos, hopanos e esteranos aromáticos. Neste trabalho analisou-se apenas os alquilbenzenos, alquilnaftalenos e

alquilfenantrenos [Figura 90] devido ao fato de serem mais suscetíveis ao processo de biodegradação. Devido a isso, a análise para estes compostos foi realizada no ensaio com P1 adsorvido em areia porque o processo de biodegradação foi mais acentuado.

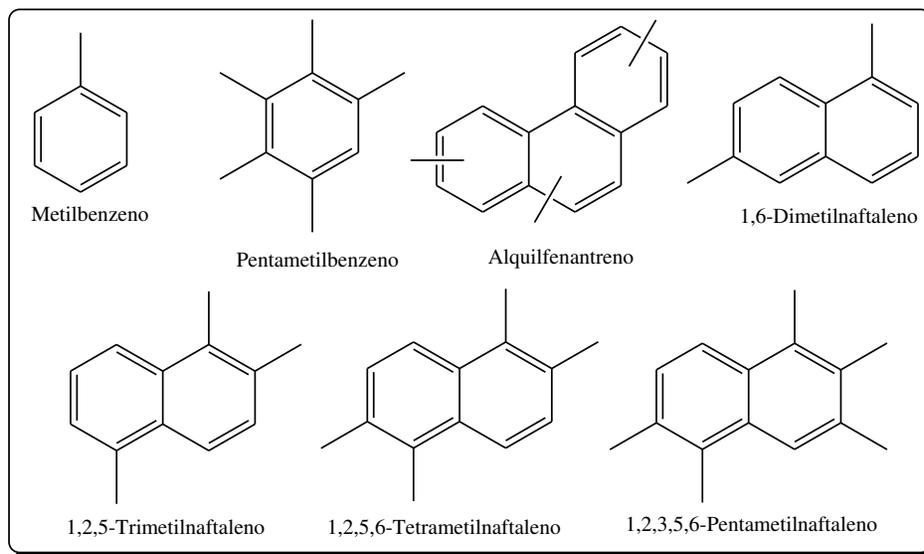


Figura 90. Estrutura de alquilbenzenos, alquilfenantrenos e alquilnaftalenos encontrado em óleos e sedimentos.

Os perfis obtidos para os compostos aromáticos aqui avaliados foram comparados com dados da literatura e a atribuição dos picos assinalados foi efetuada por comparação com os trabalhos de Rebouças (1992) e Passos (1993), principalmente.

Nas análises por CG-EM monitorou-se os íons-fragmentos m/z 92 para os metilbenzenos e o m/z 105 para os dimetilbenzenos [Figuras 91e 92].

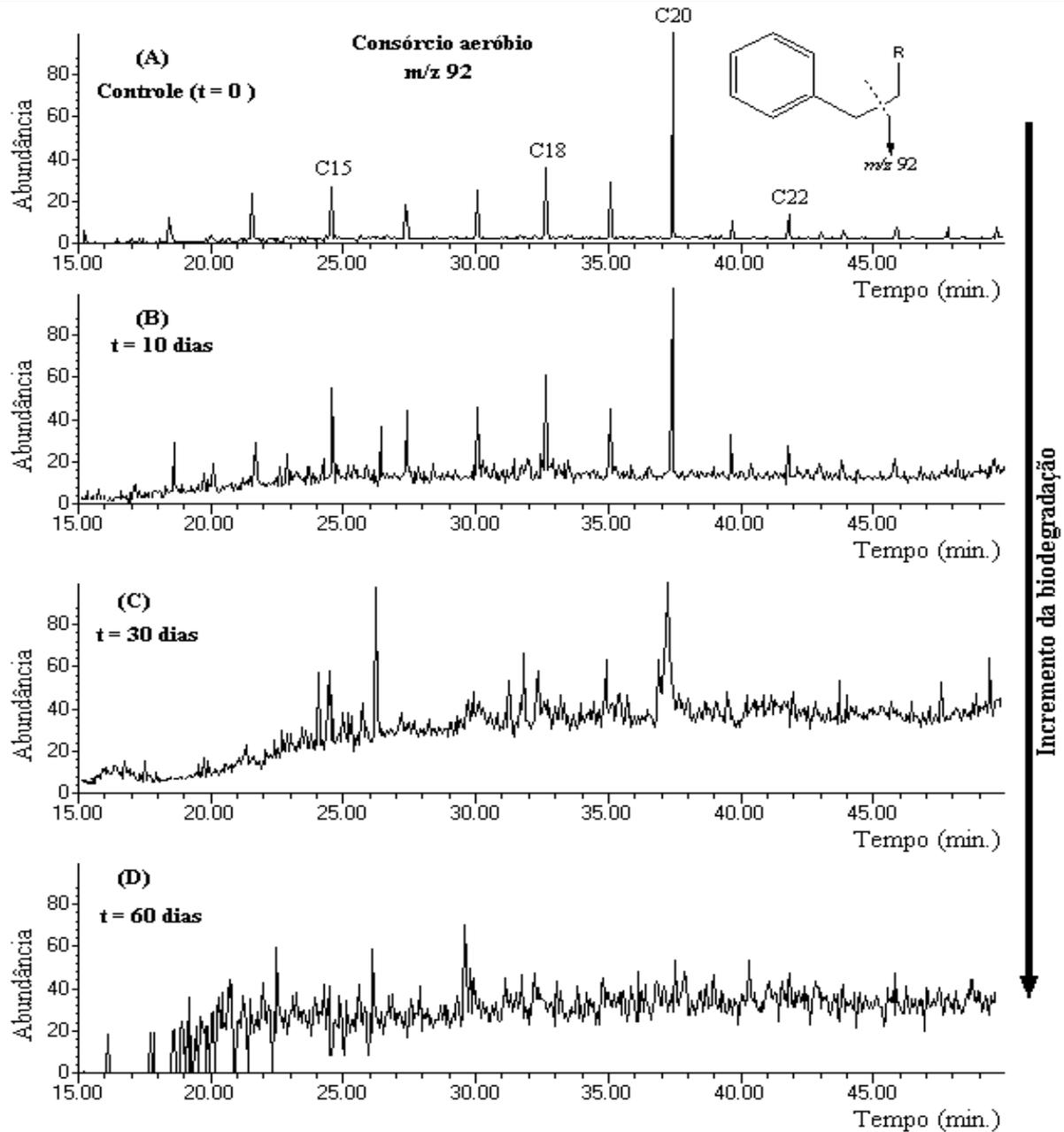


Figura 91. RIC m/z 92 para P1 adsorvido em areia com consórcio aeróbio mostrando o incremento da biodegradação de alquibenzenos.

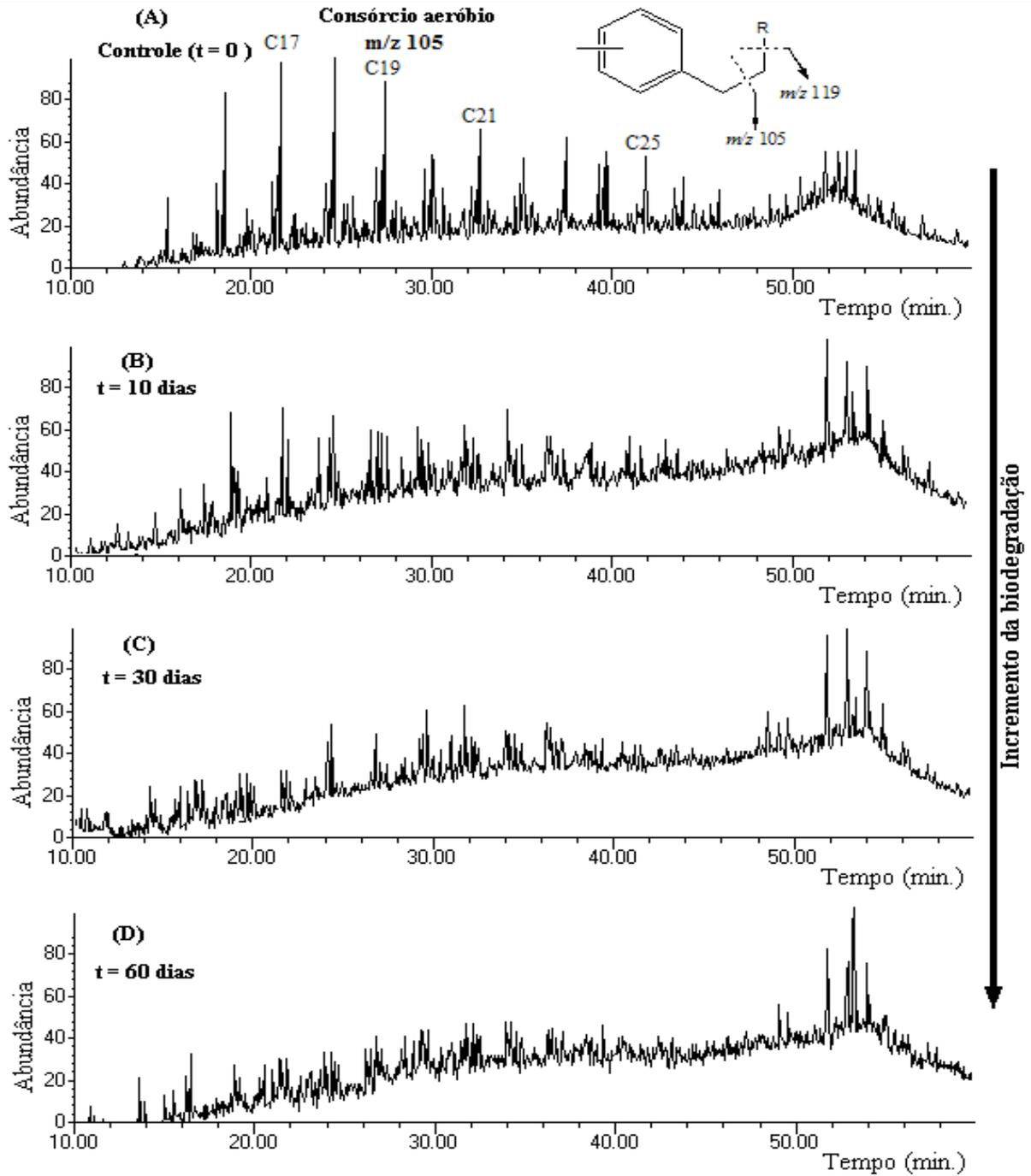


Figura 92. RIC m/z 105 para P1 adsorvido em areia com consórcio aeróbio mostrando o incremento da biodegradação de alquibenzenos.

A análise do íon-fragmento m/z 92 revelou uma série entre C_{13} - C_{25} com maior abundância em m/z C_{20} , enquanto os alquilbenzenos monitorados pelo íon-fragmento m/z 105 apresentou distribuição em uma maior faixa de massas (C_{15} - C_{33}). Observa-se ao longo do processo de biodegradação que os consórcios aeróbios removem seletivamente ambas as classes de compostos, mostrando a baixa resistência que eles possuem nestas condições.

Óleos e sedimentos de baixa maturidade têm apresentado grande abundância de metilnaftalenos, tais como: 1,6-dimetilnaftaleno, 1,2,5-trimetilnaftaleno, 1,2,5,6-tetrametilnaftaleno e 1,2,3,5,6-pentametilnaftaleno. A resistência à biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos aumenta com o número de anéis e com o aumento de substituintes alquilas e por isso os isômeros com padrão de substituição 1,6 são os mais vulneráveis ao ataque (Radke, 1987). As análises por CG-EM foram monitoradas através dos íons-fragmentos m/z 142 e m/z 156 [**Figuras 93 e 94**].

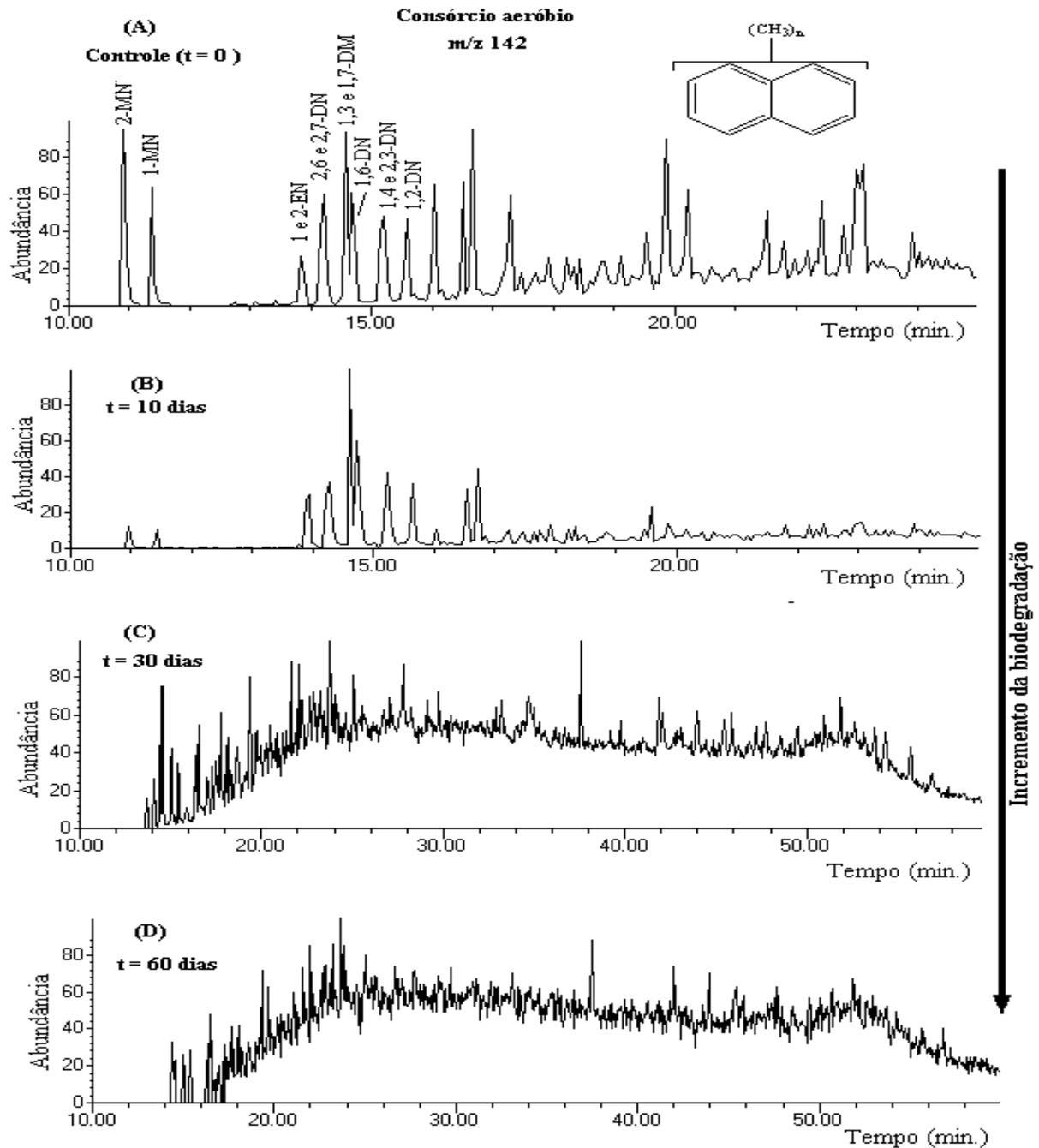


Figura 93. RIC m/z 142 para P1 adsorvido em areia com consórcio aeróbio mostrando o incremento da biodegradação de alquilnaftalenos. MN = metilnaftaleno; EN = etilnaftaleno e DN = dimetilnaftaleno.

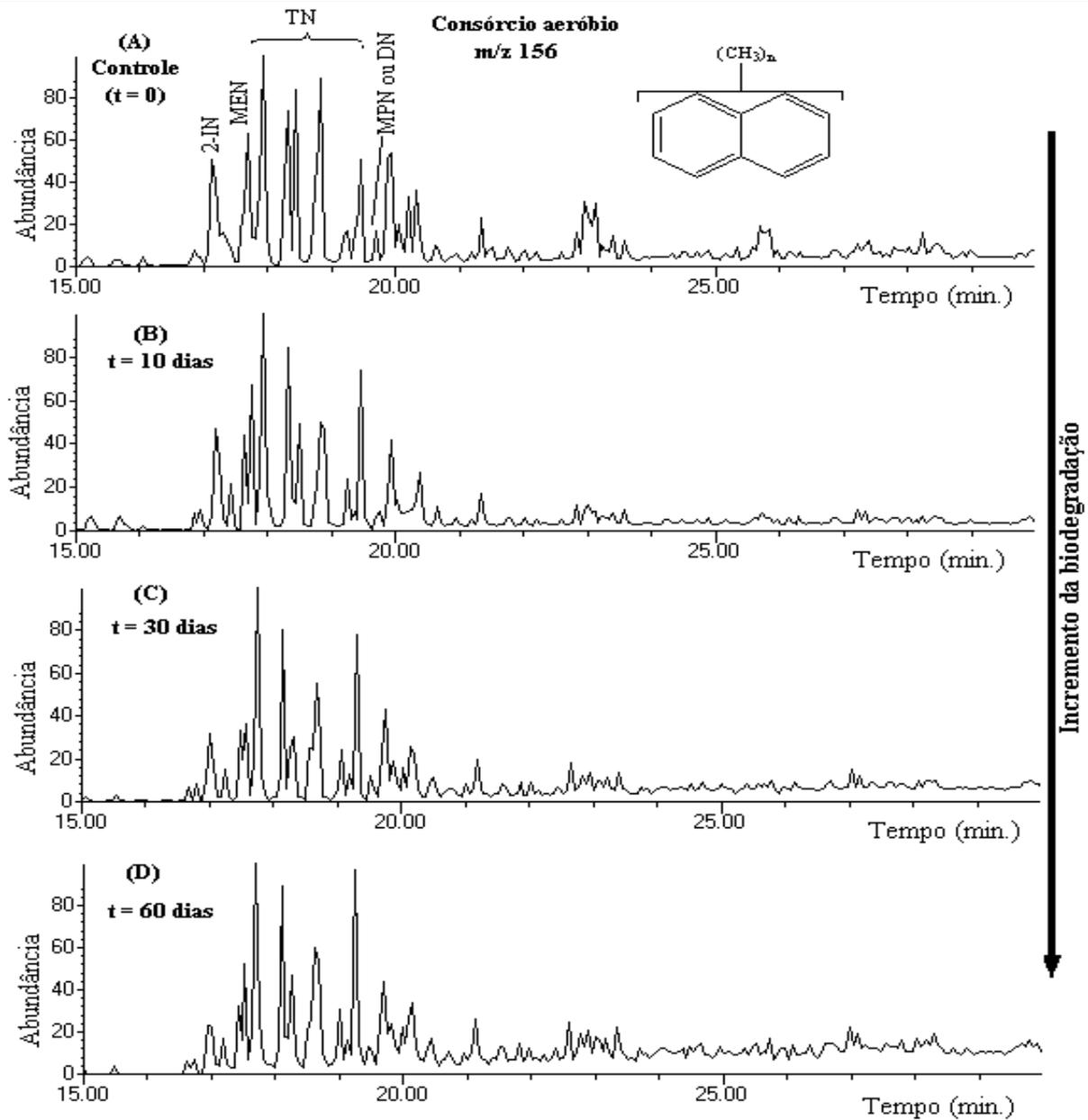


Figura 94. RIC m/z 156 para P1 adsorvido em areia com consórcio aeróbio mostrando o incremento da biodegradação de alquilnaftalenos. IN = isopropilnaftaleno; MEN = metiletilnaftaleno; TN = trimetilnaftaleno; MPN = metilpropilnaftaleno e DN = dimetilnaftaleno.

Os alquilfenantrenos foram monitorados pelos íons m/z 192 e m/z 206 [Figuras 95e 96].

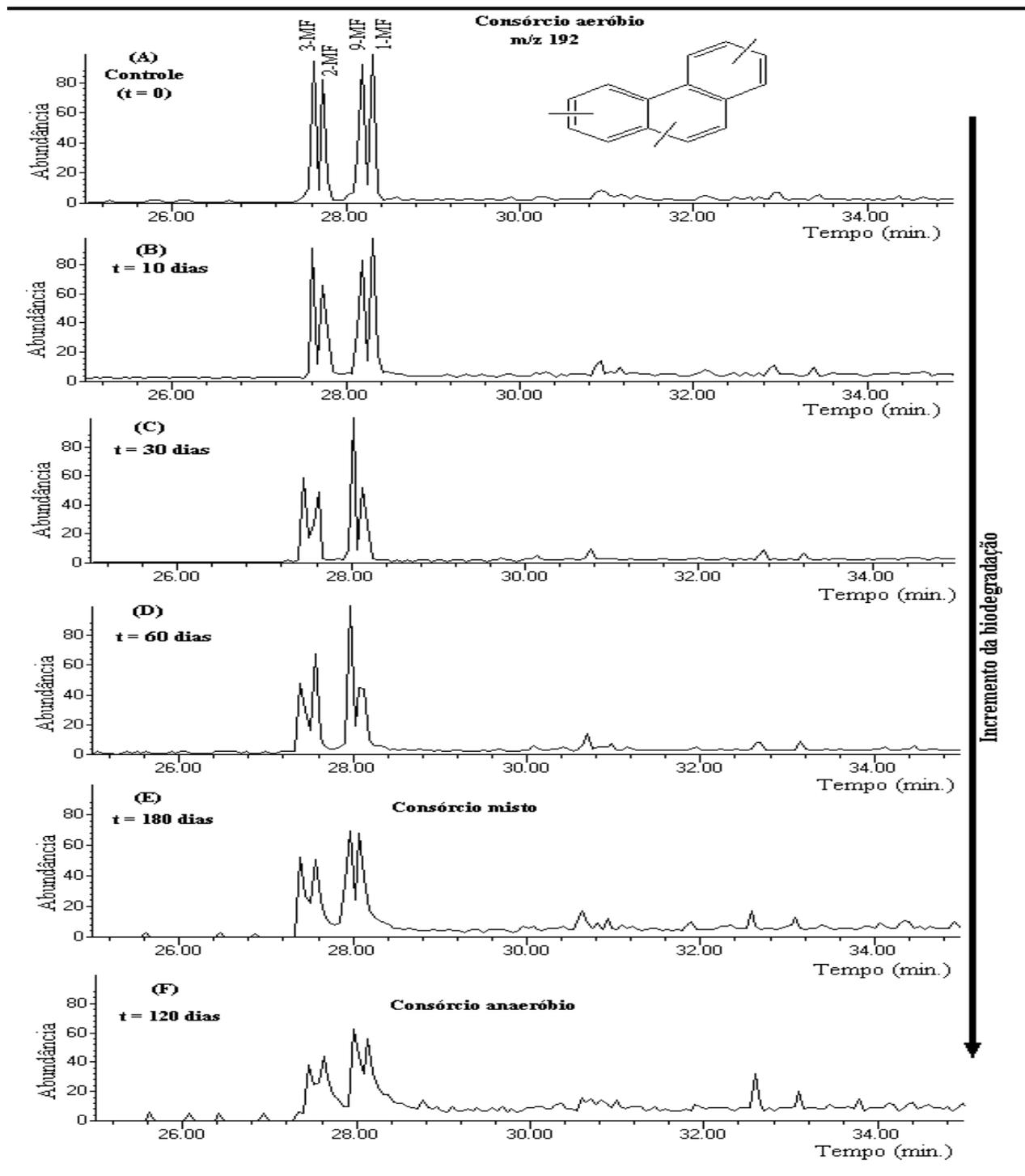


Figura 95. RIC m/z 192 para P1 adsorvido em areia mostrando o incremento da biodegradação de alquilfenantrenos com (B), (C), (D) consórcio aeróbio, (E) misto e (F) anaeróbio. MF = metilfenantreno.

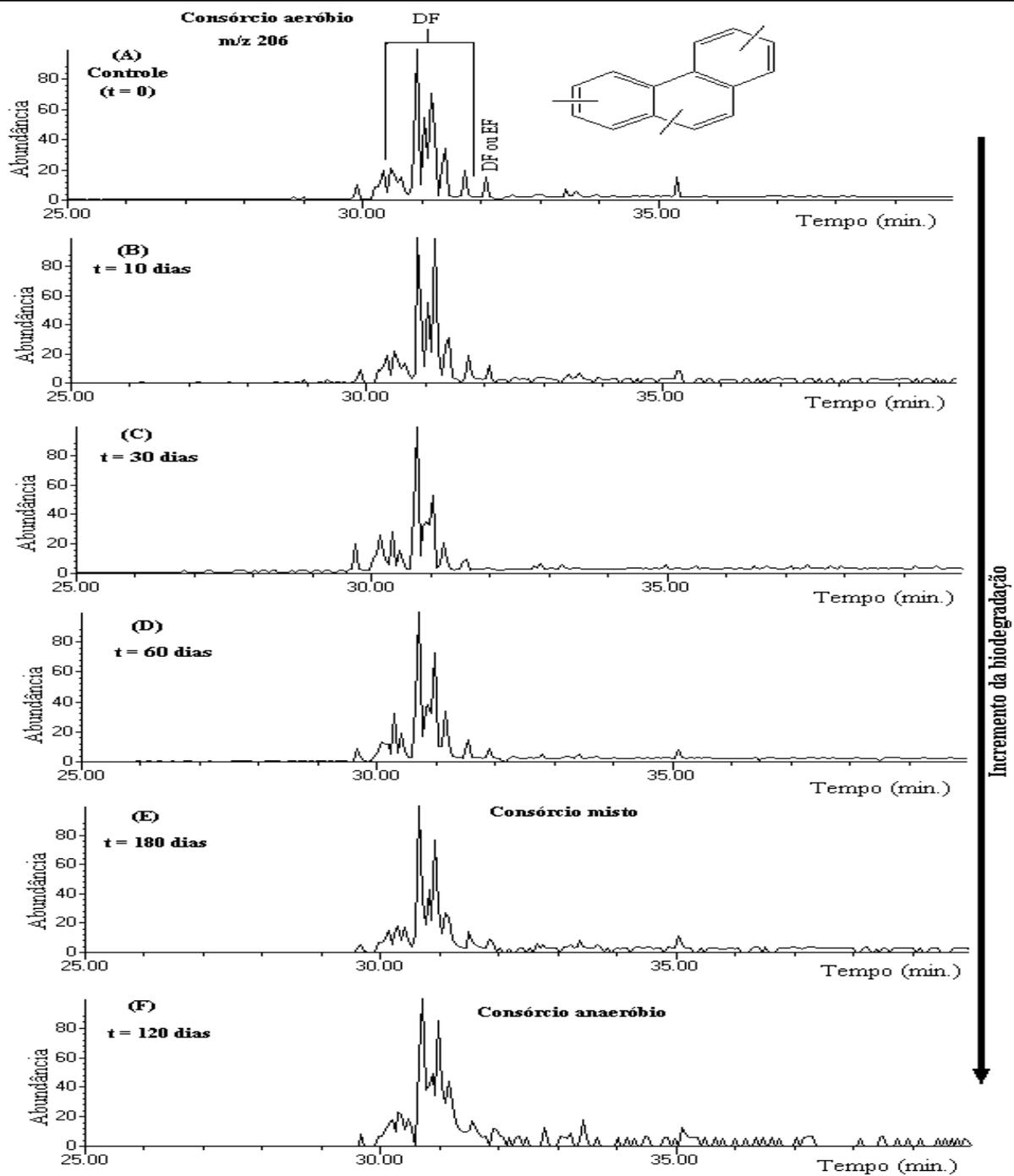


Figura 96. RIC m/z 206 para P1 adsorvido em areia mostrando o incremento da biodegradação de alquilfenantrenos com (B), (C), (D) consórcio aeróbio, (E) misto e (F) anaeróbio. DF = dimetilfenantreno e EF = etilfenantreno.

Os metil (MN), dimetilnaftalenos (DN) e alquilfenantrenos foram mais suscetíveis ao processo de biodegradação aeróbia que os trimetilnaftalenos (TN). Diferente do que é observado em reservatório onde os alquilfenentrenos são os mais resistentes a biodegradação (Killops & Killops, 1993). Os consórcios anaeróbios e mistos degradaram mais efetivamente estes compostos que os aeróbios, mostrando que eles biodegradam preferencialmente os aromáticos e não *n*-alcanos.

Até aqui foi visto que a biodegradação individual das várias classes de biomarcadores difere substancialmente de uma classe para outra e depende do número de carbonos da série homóloga e das condições usadas no experimento. Isto ocorre através de um processo quase seqüencial, normalmente a partir dos *n*-alcanos, isoprenóides, terpanos bicíclicos até 25-norhopanos e diasteranos, com particularidades para cada condição utilizada. Estas diferenças observadas também podem ser traduzidas através da interpretação de parâmetros geoquímicos que são afetados durante o processo de biodegradação.

3.2.4 PARÂMETROS GEOQUÍMICOS OBTIDOS NA FRAÇÃO NEUTRA PARA TODOS OS EXPERIMENTOS REALIZADOS

Os parâmetros geoquímicos analisados neste estudo foram utilizados para auxiliar no entendimento sobre as mudanças ocasionadas nas classes de biomarcadores durante o processo de biodegradação. Os cálculos foram realizados a partir da área de cada pico obtido pelas técnicas de TIC e SIM.

Os parâmetros obtidos a partir da análise dos cromatogramas em *m/z* 71 encontram-se na **Tabela 43**.

Tabela 43. Parâmetros geoquímicos obtidos para os diferentes tipos de ensaio com consórcios aeróbios, anaeróbio e mistos utilizando o íon-fragmento m/z 71

Tipo de ensaio	Razões obtidas	Tempo de monitoramento (dias)						
		Controle	10	20	30	40	50	60
A	IPC	1,47 ± 0,45	1,34 ± 0,32	1,26 ± 0,61	1,09 ± 0,59	1,00 ± 0,45	0,57 ± 0,08	-----
	P/n-C ₁₇	0,86 ± 1,02	0,86 ± 0,35	1,00 ± 0,82	1,82 ± 0,56	2,00 ± 0,41	-----	-----
	F/n-C ₁₈	0,94 ± 0,48	0,95 ± 1,11	0,98 ± 0,89	1,00 ± 0,33	1,20 ± 0,13	1,85 ± 0,60	-----
	P/F	2,30 ± 0,54	1,52 ± 0,23	1,45 ± 1,52	1,15 ± 1,58	0,52 ± 0,53	0,41 ± 1,18	-----
B	IPC	1,47 ± 0,45	1,07 ± 1,70	1,22 ± 0,24	0,81 ± 0,18	0,85 ± 0,59	0,87 ± 1,76	0,76 ± 1,16
	P/n-C ₁₇	0,86 ± 1,02	0,49 ± 0,52	0,54 ± 1,05	1,21 ± 1,52	1,95 ± 0,31	-----	-----
	F/n-C ₁₈	0,94 ± 0,48	1,01 ± 1,25	1,47 ± 1,13	1,65 ± 0,56	1,85 ± 0,18	1,94 ± 0,42	-----
	P/F	2,30 ± 0,54	1,56 ± 1,02	1,17 ± 0,20	1,15 ± 0,04	1,12 ± 1,35	1,11 ± 1,04	1,07 ± 0,06
C		Controle	30	60	90	120	150	180
	IPC	1,47 ± 0,45	0,82 ± 0,31	1,03 ± 0,24	1,01 ± 0,72	1,10 ± 0,45	1,04 ± 0,13	1,15 ± 1,10
	P/n-C ₁₇	0,86 ± 1,02	0,87 ± 0,70	0,89 ± 1,12	0,90 ± 0,42	0,98 ± 1,03	1,00 ± 0,90	1,04 ± 1,56
	F/n-C ₁₈	0,94 ± 0,48	0,89 ± 0,32	0,96 ± 1,27	0,94 ± 1,00	0,99 ± 0,65	1,01 ± 1,23	1,03 ± 1,82

	P/F	2,30 ± 0,54	1,55 ± 0,20	1,16 ± 0,62	1,13 ± 0,25	1,04 ± 1,13	1,02 ± 1,50	0,99 ± 0,27
D	IPC	1,47 ± 0,45	0,79 ± 1,37	0,85 ± 1,41	0,96 ± 0,07	1,05 ± 0,15	0,99 ± 1,25	1,08 ± 0,69
	P/n-C ₁₇	0,86 ± 1,02	0,85 ± 0,13	0,90 ± 0,91	1,10 ± 1,23	1,21 ± 0,16	1,26 ± 1,16	1,43 ± 0,82
	F/n-C ₁₈	0,94 ± 0,48	0,76 ± 1,62	0,89 ± 0,57	0,98 ± 2,13	1,27 ± 0,26	1,79 ± 1,19	1,81 ± 0,79
	P/F	2,30 ± 0,54	1,52 ± 0,23	1,33 ± 1,40	1,29 ± 1,18	1,26 ± 0,72	1,22 ± 1,03	1,17 ± 0,21
		Controle	10	20	30	40	50	60
E	IPC	1,47 ± 0,45	1,17 ± 1,82	1,02 ± 1,22	0,86 ± 1,11	0,72 ± 0,08	-----	-----
	P/n-C ₁₇	0,86 ± 1,02	0,84 ± 0,34	0,99 ± 1,12	1,02 ± 0,12	1,11 ± 1,05	3,22 ± 1,13	-----
	F/n-C ₁₈	0,94 ± 0,48	0,94 ± 0,35	0,99 ± 1,95	1,01 ± 0,25	2,20 ± 1,36	-----	-----
	P/F	2,30 ± 0,54	1,33 ± 0,52	1,26 ± 0,27	1,23 ± 0,99	1,09 ± 1,00	0,82 ± 1,18	-----
F	IPC	1,47 ± 0,45	1,31 ± 0,99	1,00 ± 1,10	1,07 ± 2,23	0,63 ± 0,46	-----	-----
	P/n-C ₁₇	0,86 ± 1,02	0,89 ± 1,02	0,95 ± 1,71	0,99 ± 0,11	3,04 ± 0,59	-----	-----
	F/n-C ₁₈	0,94 ± 0,48	0,80 ± 1,28	0,96 ± 0,82	0,98 ± 0,95	1,99 ± 0,21	-----	-----
	P/F	2,30 ± 0,54	1,20 ± 0,66	1,16 ± 0,42	1,09 ± 0,23	1,01 ± 0,50	-----	-----
		Controle	30	60	90	120	150	180

G	IPC	1,47 ± 0,45	0,93 ± 1,31	1,10 ± 0,74	1,01 ± 1,76	1,14 ± 0,32	1,02 ± 0,23	1,01 ± 1,03
	P/n-C₁₇	0,86 ± 1,02	0,71 ± 1,14	0,87 ± 0,95	0,92 ± 0,41	0,95 ± 1,41	1,02 ± 0,20	1,05 ± 1,34
	F/n-C₁₈	0,94 ± 0,48	0,86 ± 1,53	0,99 ± 1,42	1,00 ± 0,98	1,39 ± 0,35	1,41 ± 0,65	1,52 ± 0,86
	P/F	2,30 ± 0,54	1,89 ± 0,35	1,62 ± 0,59	1,15 ± 0,29	1,12 ± 1,02	1,10 ± 0,57	1,07 ± 0,53
H	IPC	1,47 ± 0,45	0,96 ± 0,41	0,97 ± 0,24	0,98 ± 1,21	1,01 ± 0,15	1,00 ± 1,75	1,02 ± 0,90
	P/n-C₁₇	0,86 ± 1,02	0,66 ± 1,16	0,75 ± 0,23	0,76 ± 1,02	0,99 ± 0,18	1,01 ± 1,57	1,35 ± 2,10
	F/n-C₁₈	0,94 ± 0,48	0,57 ± 0,61	0,65 ± 0,57	0,75 ± 1,18	0,77 ± 0,16	0,87 ± 0,98	0,98 ± 0,40
	P/F	2,30 ± 0,54	1,13 ± 0,13	1,04 ± 0,34	0,98 ± 1,25	0,97 ± 1,56	0,75 ± 1,94	0,71 ± 0,20
I		Controle	10	20	30	40	50	60
	IPC	1,47 ± 0,45	1,44 ± 0,75	1,18 ± 0,43	1,07 ± 0,95	0,98 ± 0,54	0,68 ± 0,80	0,52 ± 0,71
	P/n-C₁₇	0,86 ± 1,02	0,60 ± 0,21	0,92 ± 0,28	0,97 ± 1,28	1,11 ± 0,21	1,29 ± 1,35	2,45 ± 0,39
	F/n-C₁₈	0,94 ± 0,48	0,94 ± 0,42	0,96 ± 0,78	0,98 ± 0,51	0,98 ± 1,02	0,99 ± 1,00	2,01 ± 0,83
	P/F	2,30 ± 0,54	2,09 ± 1,02	1,53 ± 0,52	1,28 ± 0,46	1,22 ± 0,89	1,19 ± 1,25	1,08 ± 0,53
J		Controle	30	60	90	120	150	180
	IPC	1,47 ± 0,45	0,98 ± 1,13	1,01 ± 0,47	1,04 ± 1,67	1,11 ± 0,23	1,03 ± 0,32	1,02 ± 1,30
	P/n-C₁₇	0,86 ± 1,02	0,78 ± 1,41	0,88 ± 0,59	0,90 ± 0,41	0,92 ± 1,14	0,95 ± 0,02	0,98 ± 1,43

	<i>F/n-C₁₈</i>	0,94 ± 0,48	0,91 ± 1,35	1,01 ± 1,24	1,06 ± 0,89	1,59 ± 0,53	1,71 ± 0,56	1,82 ± 0,68
	<i>P/F</i>	2,30 ± 0,54	1,54 ± 0,63	1,26 ± 0,95	1,05 ± 0,92	1,02 ± 1,20	1,00 ± 0,75	0,97 ± 0,38
L	<i>IPC</i>	1,47 ± 0,45	0,89 ± 1,72	0,91 ± 1,98	0,93 ± 0,29	1,10 ± 0,12	1,02 ± 1,26	1,04 ± 0,21
	<i>P/n-C₁₇</i>	0,86 ± 1,02	0,82 ± 0,12	0,88 ± 0,90	1,00 ± 1,21	1,15 ± 0,24	1,28 ± 1,15	1,41 ± 0,80
	<i>F/n-C₁₈</i>	0,94 ± 0,48	0,52 ± 1,58	0,98 ± 0,65	1,04 ± 2,30	1,07 ± 0,21	1,19 ± 1,12	1,27 ± 0,42
	<i>P/F</i>	2,30 ± 0,54	1,88 ± 0,51	1,50 ± 2,04	1,24 ± 1,13	1,12 ± 0,75	0,98 ± 1,01	0,86 ± 0,09
		Controle	10	20	30	40	50	60
M	<i>IPC</i>	1,47 ± 0,45	1,00 ± 1,07	1,02 ± 0,42	0,91 ± 0,83	0,95 ± 0,65	0,82 ± 1,63	0,66 ± 0,61
	<i>P/n-C₁₇</i>	0,86 ± 1,02	0,58 ± 0,29	0,89 ± 1,50	0,98 ± 1,32	0,98 ± 0,15	1,01 ± 0,18	3,12 ± 0,55
	<i>F/n-C₁₈</i>	0,94 ± 0,48	0,91 ± 1,56	0,95 ± 1,36	0,96 ± 0,68	1,05 ± 0,82	1,09 ± 0,28	2,10 ± 0,86
	<i>P/F</i>	2,30 ± 0,54	1,76 ± 1,22	1,29 ± 0,84	1,22 ± 0,95	1,18 ± 1,45	1,13 ± 1,00	1,01 ± 0,61
		Controle	30	60	90	120	150	180
N	<i>IPC</i>	1,47 ± 0,45	0,82 ± 0,31	1,03 ± 0,24	1,01 ± 0,72	1,10 ± 0,45	1,04 ± 0,13	1,15 ± 1,10
	<i>P/n-C₁₇</i>	0,86 ± 1,02	0,87 ± 0,70	0,89 ± 1,12	0,90 ± 0,42	0,98 ± 1,03	1,00 ± 0,90	1,04 ± 0,56
	<i>F/n-C₁₈</i>	0,94 ± 0,48	0,89 ± 0,32	0,96 ± 1,27	0,94 ± 1,00	0,99 ± 0,65	1,01 ± 1,23	1,03 ± 1,82
	<i>P/F</i>	2,30 ± 0,54	1,55 ± 0,20	1,16 ± 0,62	1,13 ± 0,25	1,04 ± 1,13	1,02 ± 1,50	0,99 ± 0,27

O	IPC	$1,47 \pm 0,45$	$0,58 \pm 1,65$	$0,87 \pm 1,26$	$0,92 \pm 0,52$	$1,05 \pm 0,31$	$1,01 \pm 1,05$	$1,09 \pm 0,72$
	P/n-C₁₇	$0,86 \pm 1,02$	$0,92 \pm 0,13$	$0,90 \pm 0,42$	$1,26 \pm 1,25$	$1,86 \pm 0,54$	$1,92 \pm 1,16$	$2,09 \pm 0,59$
	F/n-C₁₈	$0,94 \pm 0,48$	$1,01 \pm 1,56$	$1,13 \pm 0,66$	$1,58 \pm 1,03$	$1,72 \pm 0,15$	$1,79 \pm 1,26$	$2,17 \pm 0,29$
	P/F	$2,30 \pm 0,54$	$1,54 \pm 0,51$	$1,43 \pm 2,04$	$1,29 \pm 1,11$	$1,38 \pm 0,78$	$1,09 \pm 1,22$	$1,01 \pm 0,26$

A = P1 adicionado direto ao meio + Co1;
B = P1 adicionado direto ao meio + Co2;
C = P1 adicionado direto ao meio + AN;
D = P1 adicionado direto ao meio + Co1AN;
E = P1 adsorvido em areia + Co1;
F = P1 adsorvido em areia + Co2;
G = P1 adsorvido em areia + AN;

H = P1 adsorvido em areia + Co1AN;
I = P1 adsorvido em folhelho FSA + Co1;
J = P1 adsorvido em folhelho FSA + AN;
L = P1 adsorvido em folhelho FSA + Co1AN;
M = P1 adsorvido em folhelho FB + Co2;
N = P1 adsorvido em folhelho FB + AN;
O = P1 adsorvido em folhelho FB + Co2AN.

Como já discutido, os parâmetros calculados revelam que em condições aeróbias o IPC tende a diminuir com o processo de biodegradação, contrário ao observado para os ensaios em condições anaeróbias onde este índice aumenta com a biodegradação. Nos experimentos que utiliza o consórcio misto observam-se valores de $IPC < 1$ de 30 a 90 dias e $IPC > 1$ de 120 a 180, evidenciando a influência de ambos os consórcios.

As razões $P/n-C_{17}$ e $F/n-C_{18}$ aumentam e a razão P/F diminui com a biodegradação, independente das condições experimentais utilizadas, evidenciando biodegradação preferencial de n -alcanos comparando-se aos compostos ramificados, tais como P e F para todos os consórcios envolvidos no processo de biodegradação.

Adicionalmente a estes resultados, calculou-se alguns parâmetros para os biomarcadores mais resistentes, para auxiliar no entendimento sobre a suscetibilidade destes compostos durante o processo de biodegradação [**Tabela 44**].

Tabela 44. Parâmetros geoquímicos obtidos para os diferentes tipos de ensaio com consórcios aeróbios, anaeróbio e mistos utilizando os íons-fragmentos m/z 177, 191 e 217

Ensaio	Razões obtidas	Tempo de monitoramento (dias)								
		Controle	10	20	30	40	50	60	P2	
A*	$C_{28}TT/C_{35}H^a$	0,91 ± 0,54	0,98 ± 1,78	0,99 ± 0,62	1,04 ± 0,32	1,11 ± 0,54	1,12 ± 0,54	1,16 ± 0,54	1,10 ± 1,42	
	$C_{29}TT/C_{35}H^a$	1,12 ± 0,19	1,29 ± 1,91	1,33 ± 0,95	1,36 ± 3,13	1,44 ± 1,16	1,46 ± 0,15	1,50 ± 1,51	1,47 ± 1,02	
	$C_{35}H/C_{30}H^b$	0,61 ± 1,21	0,58 ± 1,48	0,65 ± 0,51	0,69 ± 0,16	0,67 ± 1,25	1,03 ± 0,95	1,38 ± 1,43	1,89 ± 1,85	
	Ts/Tm^c	0,41 ± 0,37	0,35 ± 0,45	0,38 ± 3,24	0,37 ± 1,19	0,40 ± 1,42	0,41 ± 1,14	0,42 ± 0,51	0,38 ± 1,58	
	IH^d	17,30 ± 1,73	17,24 ± 1,63	16,56 ± 1,05	14,89 ± 0,94	14,63 ± 1,19	14,41 ± 1,16	14,32 ± 0,23	27,36 ± 0,56	
	Esterano/ Hopano ^e	1,11 ± 1,23	1,09 ± 1,80	1,28 ± 1,22	1,76 ± 1,02	2,28 ± 0,15	2,36 ± 2,23	3,86 ± 0,15	5,94 ± 0,25	
	25-NH ^f	17,51 ± 0,84	16,02 ± 1,62	17,58 ± 1,75	17,64 ± 0,99	17,86 ± 2,15	17,97 ± 0,85	18,04 ± 0,74	18,63 ± 0,20	
	B	$C_{28}TT/C_{35}H^a$	0,91 ± 1,48	0,94 ± 0,16	0,96 ± 0,89	0,99 ± 1,76	1,08 ± 0,67	1,10 ± 1,21	1,14 ± 0,09	1,10 ± 1,42

$C_{29}TT/C_{35}H^a$	1,12	0,99	1,08	1,29	1,31	1,39	1,62	1,47
	± 0,42	± 0,62	± 0,31	± 1,98	± 2,08	± 1,01	± 0,18	± 1,02
$C_{35}H/C_{30}H^b$	0,61	0,59	0,63	0,72	0,76	0,93	1,34	1,89
	± 0,21	± 1,63	± 0,29	± 1,92	± 1,13	± 2,03	± 1,08	± 1,85
Ts/Tm ^c	0,41	0,32	0,40	0,39	0,41	0,42	0,43	0,38
	± 0,15	± 0,04	± 1,22	± 2,72	± 1,67	± 1,12	± 0,34	± 1,58
IH ^d	17,30	16,89	16,13	16,08	15,50	14,76	14,24	27,36
	± 0,13	± 0,81	± 0,65	± 2,27	± 1,14	± 1,24	± 1,55	± 0,56
Esterano/ Hopano ^e	1,11	1,02	1,16	1,55	1,69	2,27	2,93	5,94
	± 0,37	± 0,98	± 0,97	± 0,60	± 2,55	± 1,47	± 1,96	± 0,25
25-NH ^f	17,51	17,46	17,84	17,98	18,01	18,13	18,19	18,63
	± 1,18	± 2,15	± 0,15	± 1,48	± 1,82	± 1,31	± 1,45	± 0,20

	Controle	30	60	90	120	150	180	
$C_{28}TT/C_{35}H^a$	0,92	1,18	0,89	0,86	0,74	0,59	0,57	1,10
	± 2,31	± 1,03	± 2,30	± 0,42	± 0,64	± 0,65	± 1,24	± 1,42
$C_{29}TT/C_{35}H^a$	1,06	1,14	1,09	1,02	0,93	0,84	0,58	1,47
	± 1,32	± 0,61	± 0,39	± 0,59	± 0,86	± 1,29	± 2,21	± 1,02
C $C_{35}H/C_{30}H^b$	0,60	0,61	0,58	0,56	0,57	0,46	0,44	1,89
	± 2,02	± 0,73	± 0,75	± 0,57	± 0,72	± 1,08	± 0,26	± 1,85
Ts/Tm ^c	0,43	0,37	0,39	0,40	0,43	0,42	0,46	0,38
	± 0,32	± 0,48	± 0,34	± 0,32	± 0,32	± 2,14	± 0,35	± 1,58
IH ^d	17,20	17,14	17,98	18,26	20,42	25,64	25,92	27,36
	± 2,01	± 1,42	± 0,24	± 1,23	± 1,91	± 2,00	± 1,54	± 0,56

Esterano/	1,29	1,18	1,14	1,11	1,06	0,99	0,97	5,94
Hopano ^e	± 0,13	± 1,60	± 1,99	± 0,43	± 1,52	± 0,40	± 1,63	± 0,25
25-NH ^f	17,22	17,56	17,12	16,89	16,52	15,49	15,44	18,63
	± 1,25	± 1,26	± 1,94	± 0,57	± 0,84	± 2,02	± 0,60	± 0,20

D	C ₂₈ TT/C ₃₅ H ^a	0,92	1,40	1,48	1,52	1,13	1,06	1,04	1,10
		± 2,22	± 0,84	± 0,60	± 0,93	± 2,01	± 1,01	± 0,84	± 1,42
	C ₂₉ TT/C ₃₅ H ^a	1,06	1,21	1,83	2,01	1,22	1,18	1,23	1,47
		± 0,99	± 0,76	± 1,81	± 0,56	± 1,81	± 1,99	± 1,81	± 1,02
	C ₃₅ H/C ₃₀ H ^b	0,60	0,60	0,62	0,68	0,53	0,56	0,54	1,89
		± 0,96	± 1,01	± 1,65	± 0,54	± 0,37	± 0,97	± 1,52	± 1,85
	Ts/Tm ^c	0,43	0,37	0,37	0,38	0,38	0,39	0,41	0,38
		± 0,72	± 1,00	± 0,56	± 1,09	± 0,79	± 1,35	± 1,19	± 1,58
IH ^d	17,20	16,44	16,29	16,15	17,83	17,78	19,69	27,36	
	± 0,53	± 0,95	± 1,87	± 1,23	± 0,43	± 1,48	± 0,86	± 0,56	
Esterano/	1,29	1,43	1,54	1,78	1,27	1,16	1,09	5,94	
Hopano ^e	± 0,41	± 0,91	± 0,12	± 0,41	± 0,92	± 1,18	± 1,82	± 0,25	
25-NH ^f	17,22	18,68	18,84	18,92	17,58	17,25	16,28	18,63	
	± 0,36	± 1,23	± 2,03	± 0,06	± 1,06	± 0,18	± 1,28	± 0,20	

	Controle	10	20	30	40	50	60	P2	
E	C ₂₈ TT/C ₃₅ H ^a	0,91	1,03	1,12	1,13	1,14	1,15	1,21	1,10
		± 1,42	± 0,69	± 0,23	± 0,89	± 1,36	± 2,26	± 1,11	± 1,42
	C ₂₉ TT/C ₃₅ H ^a	1,12	1,41	1,42	1,45	1,53	1,54	1,61	1,47

		± 1,83	± 1,22	± 1,12	± 1,32	± 1,86	± 1,47	± 0,63	± 1,02
	$C_{35}H/C_{30}H^b$	0,61	0,60	0,72	0,78	0,76	1,13	1,59	1,89
		± 1,37	± 0,88	± 1,27	± 0,41	± 1,23	± 0,99	± 0,26	± 1,85
	Ts/Tm^c	0,41	0,30	0,40	0,41	0,42	0,42	0,43	0,38
		± 0,84	± 1,30	± 2,47	± 1,27	± 1,36	± 0,29	± 0,32	± 1,58
	IH^d	17,30	16,94	16,92	15,90	15,83	14,81	12,83	27,36
		± 0,89	± 1,13	± 1,60	± 1,13	± 0,91	± 1,14	± 1,62	± 0,56
	Esterano/	1,11	1,41	1,43	1,55	2,66	2,97	4,21	5,94
	Hopano ^e	± 1,22	± 1,20	± 1,06	± 1,11	± 1,30	± 0,73	± 2,20	± 0,25
	$25-NH^f$	17,51	15,90	15,93	17,24	1,23	0,81	17,93	18,63
		± 0,61	± 1,50	± 1,41	± 0,62	± 1,56	± 1,28	± 1,02	± 0,20
	$C_{28}TT/C_{35}H^a$	0,91	0,99	1,08	1,11	1,19	1,22	1,26	1,10
		± 1,53	± 1,05	± 1,45	± 1,14	± 1,13	± 1,03	± 0,91	± 1,42
	$C_{29}TT/C_{35}H^a$	1,12	1,14	1,24	1,35	1,43	1,45	1,82	1,47
		± 1,00	± 0,42	± 1,42	± 0,41	± 0,16	± 1,21	± 1,82	± 1,02
	$C_{35}H/C_{30}H^b$	0,61	0,66	0,69	0,88	0,86	1,32	1,48	1,89
		± 1,12	± 2,15	± 1,53	± 1,22	± 1,15	± 0,19	± 0,64	± 1,85
F	Ts/Tm^c	0,41	0,32	0,41	0,60	0,72	0,43	0,43	0,38
		± 1,15	± 2,01	± 0,62	± 0,02	± 1,06	± 0,11	± 0,16	± 1,58
	IH^d	17,30	17,24	17,13	14,10	13,50	12,90	12,71	27,36
		± 0,32	± 0,92	± 1,51	± 0,41	± 1,13	± 0,61	± 0,10	± 0,56
	Esterano/	1,11	1,22	1,36	1,65	1,86	2,47	3,80	5,94
	Hopano ^e	± 0,30	± 0,21	± 1,31	± 0,73	± 1,02	± 0,81	± 0,58	± 0,25

	25-NH ^f	17,51 ± 1,55	13,92 ± 2,32	15,83 ± 1,42	16,24 ± 0,38	16,91 ± 1,43	17,93 ± 1,59	18,20 ± 0,60	18,63 ± 0,20
<hr/>									
		Controle	30	60	90	120	150	180	P2
	$C_{28}TT/C_{35}H^a$	0,92 ± 1,01	1,30 ± 1,10	0,91 ± 1,04	1,02 ± 2,21	0,62 ± 0,96	0,60 ± 1,10	0,60 ± 0,98	1,10 ± 1,42
	$C_{29}TT/C_{35}H^a$	1,06 ± 0,72	1,41 ± 1,15	1,22 ± 1,56	1,23 ± 2,04	0,81 ± 0,07	0,73 ± 1,23	0,61 ± 2,13	1,47 ± 1,02
	$C_{35}H/C_{30}H^b$	0,60 ± 0,90	0,58 ± 0,41	0,54 ± 1,03	0,54 ± 1,40	0,59 ± 1,29	0,49 ± 0,16	0,48 ± 0,72	1,89 ± 1,85
G	Ts/Tm ^c	0,43 ± 0,42	0,32 ± 1,50	0,43 ± 1,82	0,43 ± 1,33	0,44 ± 1,18	0,44 ± 1,27	0,48 ± 0,99	0,38 ± 1,58
	IH ^d	17,20 ± 0,94	17,64 ± 1,02	17,94 ± 2,03	18,70 ± 0,57	21,63 ± 1,05	29,22 ± 0,26	29,42 ± 2,25	27,36 ± 0,56
	Esterano/ Hopano ^e	1,29 ± 1,00	1,16 ± 1,23	1,14 ± 0,99	1,12 ± 0,91	1,04 ± 0,15	1,01 ± 1,21	0,99 ± 1,25	5,94 ± 0,25
	25-NH ^f	17,22 ± 1,43	17,81 ± 1,01	16,51 ± 1,98	16,33 ± 1,55	16,33 ± 1,21	15,81 ± 1,26	15,32 ± 1,02	18,63 ± 0,20
<hr/>									
	$C_{28}TT/C_{35}H^a$	0,92 ± 1,13	1,40 ± 0,90	1,48 ± 0,27	0,83 ± 0,90	1,04 ± 2,12	0,92 ± 0,82	1,01 ± 1,97	1,10 ± 1,42
H	$C_{29}TT/C_{35}H^a$	1,06 ± 0,25	1,17 ± 1,00	1,94 ± 2,72	1,25 ± 0,89	1,15 ± 1,52	1,62 ± 0,28	1,22 ± 0,96	1,47 ± 1,02
	$C_{35}H/C_{30}H^b$	0,60	0,60	0,51	0,54	0,55	0,52	0,53	1,89

	± 1,16	± 0,13	± 0,45	± 0,91	± 1,61	± 1,81	± 1,62	± 1,85
Ts/Tm ^c	0,43	0,27	0,27	0,28	0,28	0,29	0,30	0,38
	± 0,96	± 1,04	± 0,68	± 0,90	± 1,30	± 2,27	± 2,31	± 1,58
IH ^d	17,20	16,32	16,26	18,71	18,73	17,57	21,69	27,36
	± 0,89	± 1,13	± 0,86	± 1,41	± 1,27	± 0,79	± 1,17	± 0,56
Esterano/	1,29	1,32	1,35	1,87	1,72	1,70	1,59	5,94
Hopano ^e	± 0,62	± 1,04	± 1,87	± 0,85	± 0,72	± 1,17	± 0,23	± 0,25
25-NH ^f	17,22	18,86	18,92	17,88	17,85	16,52	16,12	18,63
	± 1,27	± 0,65	± 1,02	± 0,23	± 1,51	± 0,21	± 1,89	± 0,20

	Controle	10	20	30	40	50	60		
I	C ₂₈ TT/C ₃₅ H ^a	0,91	0,87	0,93	0,98	1,09	1,13	1,18	1,10
		± 1,12	± 0,99	± 0,94	± 1,25	± 2,01	± 1,89	± 1,20	± 1,42
	C ₂₉ TT/C ₃₅ H ^a	1,12	1,14	1,23	1,29	1,34	1,37	1,44	1,47
		± 0,24	± 1,03	± ,49	± 1,52	± 1,72	± 1,63	± 0,10	± 1,02
	C ₃₅ H/C ₃₀ H ^b	0,61	0,60	0,58	0,64	0,72	0,86	1,26	1,89
		± 1,03	± 0,98	± 1,96	± 1,62	± 1,41	± 0,27	± 1,44	± 1,85
	Ts/Tm ^c	0,41	0,40	0,42	0,41	0,38	0,40	0,43	0,38
		± 0,31	± 0,45	± 2,31	± 0,76	± 1,93	± 0,13	± 1,98	± 1,58
	IH ^d	17,30	16,98	16,65	15,99	15,36	15,14	14,23	27,36
		± 0,70	± 1,10	± 2,13	± 0,31	± 1,31	± 1,70	± 2,31	± 0,56
	Esterano/	1,11	1,16	1,36	1,67	2,09	2,64	2,86	5,94
	Hopano ^e	± 0,32	± 0,20	± 0,54	± 0,85	± 1,26	± 1,32	± 1,99	± 0,25

		17,51	17,59	17,46	17,78	17,87	17,91	17,96	18,63	
		± 0,23	± 1,55	± 0,48	± 1,37	± 0,15	± 0,55	± 1,65	± 0,20	
		Controle	30	60	90	120	150	180		
J	$C_{28}TT/C_{35}H^a$	0,92 ± 0,04	0,90 ± 1,47	0,91 ± 1,10	0,85 ± 0,27	0,74 ± 0,37	0,63 ± 1,16	0,61 ± 1,22	1,10 ± 1,42	
	$C_{29}TT/C_{35}H^a$	1,06 ± 0,92	1,08 ± 1,74	1,01 ± 1,61	0,96 ± 0,58	0,93 ± 0,18	0,87 ± 1,64	0,72 ± 1,20	1,47 ± 1,02	
	$C_{35}H/C_{30}H^b$	0,60 ± 1,02	0,56 ± 1,09	0,50 ± 0,25	0,49 ± 1,12	0,49 ± 1,81	0,46 ± 0,38	0,44 ± 1,00	1,89 ± 1,85	
	T_s/T_m^c	0,43 ± 1,16	0,42 ± 1,34	0,43 ± 1,42	0,44 ± 0,83	0,40 ± 2,00	0,45 ± 1,78	0,47 ± 2,31	0,38 ± 1,58	
	IH^d	17,20 ± 0,89	17,46 ± 0,55	17,52 ± 0,40	18,06 ± 0,43	18,36 ± 1,00	22,92 ± 1,21	24,49 ± 2,12	27,36 ± 0,56	
	Esterano/ Hopano ^e	1,29 ± 1,72	1,26 ± 0,90	1,21 ± 1,52	1,15 ± 0,49	1,07 ± 1,02	0,98 ± ,42	0,99 ± 0,52	5,94 ± 0,25	
	$25-NH^f$	17,22 ± 0,89	17,19 ± 1,17	17,15 ± 1,21	16,51 ± 0,86	16,24 ± 2,08	15,23 ± ,16	15,18 ± 1,18	18,63 ± 0,20	
	L	$C_{28}TT/C_{35}H^a$	0,92 ± 1,47	1,02 ± 0,45	1,05 ± 1,47	1,08 ± 0,31	1,02 ± 0,32	0,86 ± 0,68	0,89 ± 0,93	1,10 ± 1,42
		$C_{29}TT/C_{35}H^a$	1,06 ± 0,86	1,09 ± 1,02	1,29 ± 0,79	1,31 ± 0,70	1,19 ± 0,24	1,16 ± 0,71	1,12 ± 0,89	1,47 ± 1,02
$C_{35}H/C_{30}H^b$		0,60	0,52	0,45	0,53	0,51	0,54	0,55	1,89	

	± 0,94	± 0,48	± 0,82	± 0,89	± 1,12	± 0,56	± 1,13	± 1,85
Ts/Tm ^c	0,43	0,40	0,41	0,40	0,38	0,42	0,43	0,38
	± 2,30	± 0,54	± 0,87	± 1,55	± 1,67	± 1,52	± 1,96	± 1,58
IH ^d	17,20	17,13	16,62	16,87	17,37	17,75	22,96	27,36
	± 2,32	± 1,61	± 0,81	± 0,90	± 1,25	± 1,17	± 0,84	± 0,56
Esterano/	1,29	1,53	1,78	1,95	1,69	1,61	1,48	5,94
Hopano ^e	± 1,02	± 1,74	± 1,48	± 0,22	± 1,91	± 0,18	± 1,66	± 0,25
25-NH ^f	17,22	18,29	18,69	18,98	17,58	17,25	16,23	18,63
	± 1,71	± 1,57	± 1,65	± 1,31	± 0,93	± 0,92	± 0,59	± 0,20

	Controle	10	20	30	40	50	60		
M	C ₂₈ TT/C ₃₅ H ^a	0,91	1,01	0,99	1,06	1,09	1,12	1,12	1,10
		± 0,58	± 0,91	± 0,94	± 1,74	± 1,58	± 1,64	± 2,31	± 1,42
	C ₂₉ TT/C ₃₅ H ^a	1,12	1,11	1,19	1,22	1,42	1,48	1,51	1,47
		± 1,00	± 2,30	± 0,86	± 1,63	± 0,86	± 0,91	± 1,15	± 1,02
	C ₃₅ H/C ₃₀ H ^b	0,61	0,61	0,59	0,63	0,74	0,98	1,26	1,89
		± 1,29	± 1,76	± 1,47	± 0,19	± 1,89	± 0,14	± 1,64	± 1,85
	Ts/Tm ^c	0,41	0,35	0,39	0,40	0,41	0,41	0,42	0,38
		± 1,22	± 1,18	± 0,95	± 1,36	± 0,28	± 0,89	± 0,24	± 1,58
	IH ^d	17,30	17,31	17,09	16,89	16,05	15,67	15,43	27,36
		± 0,98	± 1,05	± 0,82	± 0,96	± 0,68	± 1,02	± 1,50	± 0,56
	Esterano/	1,11	1,26	1,61	1,72	1,98	2,39	3,42	5,94
	Hopano ^e	± 1,01	± 2,04	± 1,72	± 0,83	± 0,91	± 1,32	± 0,98	± 0,25

	25-NH ^f	17,51 ± 0,45	17,48 ± 3,12	17,65 ± 2,10	17,86 ± 1,09	18,10 ± 0,82	18,31 ± 1,01	18,49 ± 1,13	18,63 ± 0,20	
<hr/>										
		Controle	30	60	90	120	150	180		
N	$C_{28}TT/C_{35}H^a$	0,92 ± 1,07	0,94 ± 0,29	0,87 ± 1,00	0,79 ± 0,61	0,76 ± 0,61	0,69 ± 0,28	0,64 ± 0,95	1,10 ± 1,42	
	$C_{29}TT/C_{35}H^a$	1,06 ± 1,56	1,08 ± 1,22	1,01 ± 1,45	0,98 ± 0,86	0,96 ± 1,63	0,82 ± 0,65	0,60 ± 0,66	1,47 ± 1,02	
	$C_{35}H/C_{30}H^b$	0,60 ± 0,42	0,55 ± 0,84	0,56 ± 0,95	0,51 ± 0,55	0,47 ± 0,18	0,42 ± 0,15	0,41 ± 0,54	1,89 ± 1,85	
	Ts/Tm ^c	0,43 ± 2,30	0,38 ± 1,13	0,37 ± 0,24	0,41 ± 0,75	0,39 ± 0,09	0,43 ± 0,42	0,45 ± 0,48	0,38 ± 1,58	
	IH ^d	17,20 ± 1,21	17,41 ± 0,65	17,62 ± 0,21	18,24 ± 1,26	21,26 ± 1,01	24,62 ± 0,21	24,98 ± 0,45	27,36 ± 0,56	
	Esterano/ Hopano ^e	1,29 ± 1,02	1,22 ± 0,54	1,12 ± 0,90	1,08 ± 1,15	1,01 ± 1,12	0,97 ± 0,80	0,94 ± 1,02	5,94 ± 0,25	
	25-NH ^f	17,22 ± 0,48	17,21 ± 0,12	16,98 ± 1,58	15,94 ± 0,51	15,52 ± 0,29	14,92 ± 1,98	14,68 ± 0,12	18,63 ± 0,20	
	<hr/>									
	O	$C_{28}TT/C_{35}H^a$	0,92 ± 0,28	1,02 ± 1,27	1,11 ± 2,07	1,15 ± 1,91	1,09 ± 1,00	1,03 ± 0,97	0,99 ± 0,37	1,10 ± 1,42
		$C_{29}TT/C_{35}H^a$	1,06 ± 1,61	1,12 ± 2,25	1,38 ± 1,32	1,43 ± 0,14	1,32 ± 2,01	1,26 ± 0,67	1,18 ± 1,92	1,47 ± 1,02

$C_{35}H/C_{30}H^b$	0,60 ± 1,32	0,59 ± 0,93	0,61 ± 1,17	0,64 ± 0,29	0,58 ± 1,35	0,54 ± 0,48	0,51 ± 0,87	1,89 ± 1,85
Ts/Tm^c	0,43 ± 1,23	0,41 ± 1,82	0,38 ± 1,50	0,39 ± 0,27	0,40 ± 0,72	0,38 ± 0,09	0,39 ± 1,36	0,38 ± 1,58
IH^d	17,20 ± 0,45	16,92 ± 1,03	16,51 ± 0,65	16,38 ± 1,13	17,87 ± 0,13	18,96 ± 1,10	22,90 ± 0,90	27,36 ± 0,56
Esterano/ Hopano ^e	1,29 ± 0,24	1,35 ± 1,12	1,45 ± 1,27	1,88 ± 0,62	1,72 ± 0,72	1,63 ± 0,42	1,37 ± 1,00	5,94 ± 0,25
25-NH ^f	17,22 ± 0,45	17,86 ± 1,02	18,48 ± 0,48	18,75 ± 0,54	17,85 ± 0,31	17,53 ± 0,70	15,83 ± 0,32	18,63 ± 0,20

^aVer Tabela 43 (pág. 213) para siglas.

^aCalculado a partir da soma das respectivas áreas em m/z 191 de C_{28} (**pico 21**) a C_{29} (**pico 22**) terpano tricíclico (TT) ($22R + 22S$), C_{35} $17\alpha,21\beta(H)$ -homohopano ($C_{35}H$) ($22R + 22S$) (**pico 38**) e C_{35} $17\alpha,21\beta(H)$ -homohopano ($C_{35}H$) ($22R + 22S$) (**pico 38**);

^bCalculado a partir das respectivas áreas em m/z 191 de C_{30} $17\alpha,21\beta(H)$ -hopano ($C_{30}H$) (**pico 30**) e C_{35} $17\alpha,21\beta(H)$ -homohopano ($C_{35}H$) ($22R + 22S$) (**pico 38**);

^cCalculado a partir das respectivas áreas em m/z 191 de C_{27} $17\alpha(H)$ -22,29,30-trisnorhopano (Tm) (**pico 24**) e C_{27} $18\alpha(H)$ -22,29,30-trisnorneohopano (Ts) (**pico 23**);

^dCalculado a partir das respectivas áreas em m/z 191 de [C_{35} ($22R + 22S$) (**pico 38**) / (C_{31} - C_{35}) ($22R + 22S$) (**picos 32 e 35-38**) homohopanos] x 100;

^eCalculado a partir das respectivas áreas em m/z 217 de C_{27} , C_{28} e C_{29} $\alpha\alpha\alpha$ ($20R + 22S$) (**picos 45, 48, 50, 53, 54 e 56**) e $\alpha\beta\beta$ ($20R + 22S$) (**picos 46, 47, 51, 52 e 55**) esteranos regulares e a partir das respectivas áreas em m/z 191 de C_{29} - C_{33} $17\alpha(H)$ -hopanos ($20R + 22S$) (**picos 30-36**);

^fCalculado a partir das respectivas áreas em m/z 177 de [C_{30} - C_{34} 25-norhopanos (25-NH) (**picos 26-29**) / Σ C_{31} - C_{35} hopanos (m/z 191) (**picos 30-36**) + C_{30} - C_{34} 25-norhopanos (25-NH) (**picos 26-29**)] x 100;

^gMédia de duplicata, desvio padrão ($n = 2$) variou de 1,08 a 2,19.

3.2.5 ANÁLISE DA FRAÇÃO ÁCIDA

Este tópico relata os resultados preliminares realizados para a fração ácida obtida do ensaio com consórcio aeróbio e P1 disperso no meio. O estudo mais detalhado desta fração encontra-se em andamento por outros alunos pertencentes ao nosso grupo de pesquisa. Os ácidos foram extraídos do extrato bruto como mostra o **Fluxograma 2**, *pág. 281*.

As frações ácidas analisadas não foram derivatizadas a hidrocarbonetos devido a pouca quantidade obtida após extração contínua, dessa maneira foram analisadas somente como ésteres metílicos derivados dos componentes ácidos.

As frações ácida (**FAc**) e de ésteres metílicos derivados de ácidos (**FEM**) foram analisadas por infravermelho (IV). Na fração **FAc** observou-se as bandas em 1710 cm^{-1} , característica de carbonila de ácido e uma banda larga em 3420 cm^{-1} , característica de hidroxila de ácido [**Figura 97A**], enquanto que na fração **FEM** observou-se o desaparecimento da banda característica de hidroxila e uma banda em 1737 cm^{-1} característica de carbonila de éster [**Figura 97B**].

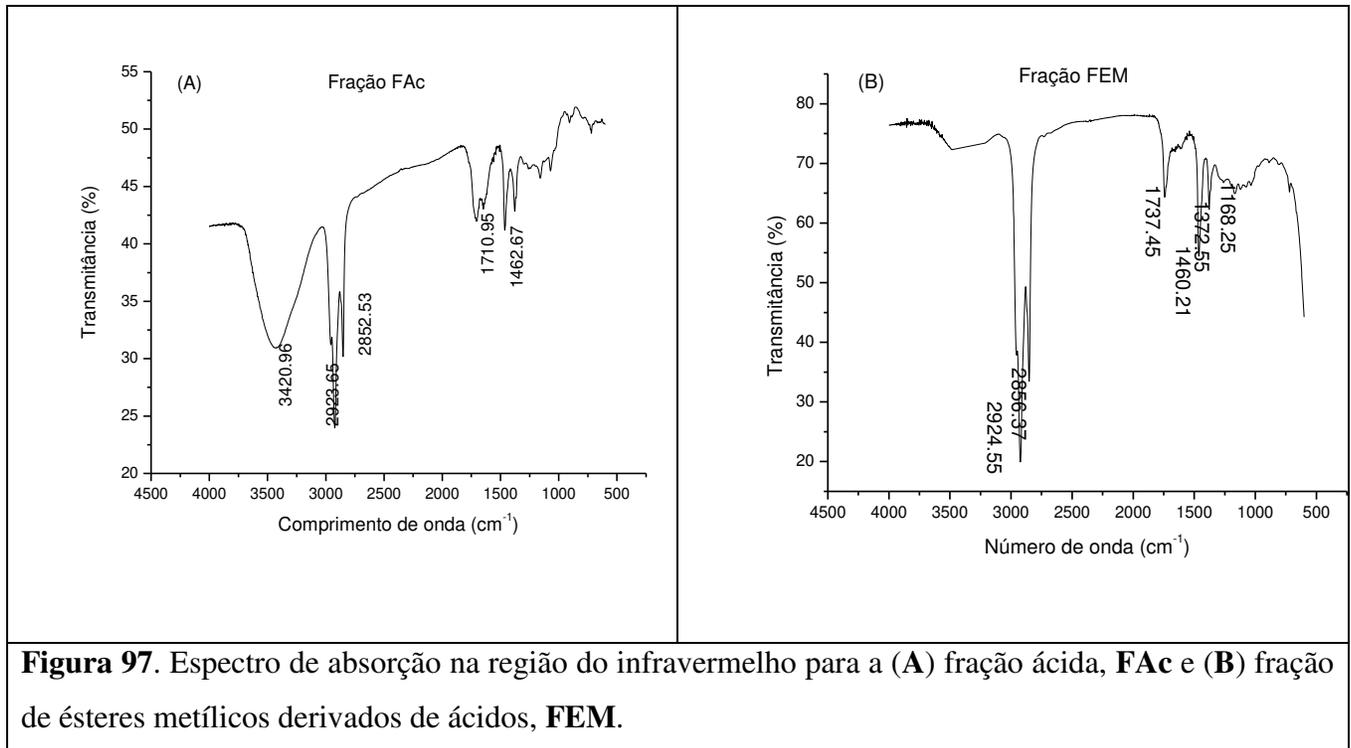


Figura 97. Espectro de absorção na região do infravermelho para a (A) fração ácida, **FAc** e (B) fração de ésteres metílicos derivados de ácidos, **FEM**.

Os ésteres metílicos derivados dos ácidos lineares foram analisados por CG-EM utilizando o RIC através do íon-fragmento m/z 74 [Figura 98].

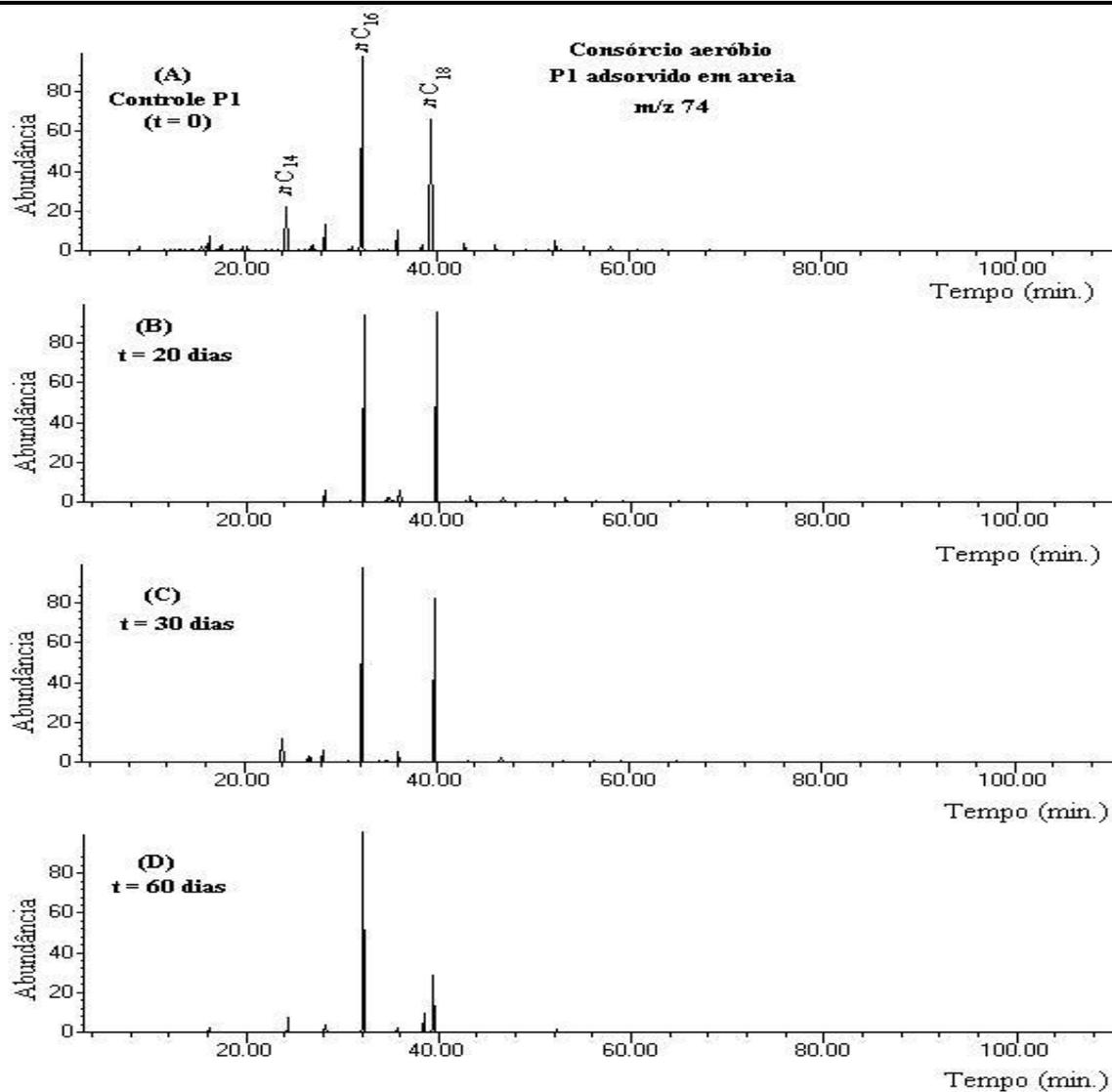


Figura 98. RIC m/z 74 obtido da análise por CG-EM da fração FEM das amostras obtidas no ensaio aeróbio com P1 adsorvido em areia.

Os ácidos carboxílicos presentes em petróleo podem ser gerados junto com os hidrocarbonetos (ácidos autóctones) durante o processo de geração do petróleo (Rodrigues, 2000), podem ser incorporados durante o processo de migração (Jaffé & Gallardo, 1993), podem ser gerados por microrganismos através de síntese “de novo” ou ainda serem derivados das membranas celulares de bactérias durante o processo de biodegradação (Mackenzie *et al.*, 1981; Behar & Albrecht, 1984).

Neste estudo, detectou-se a presença dos ésteres metílicos derivados dos ácidos hexadecanóico (C₁₆) e octadecanóico (C₁₈) em maior abundância para a amostra não biodegradada usada como controle. Com 20 dias de biodegradação notou-se a remoção dos ácidos de menor peso molecular e aumento da abundância relativa do componente C₁₈, comparado ao controle. Com o progresso da biodegradação ocorre remoção do C₁₈ em preferência ao C₁₆.

A análise da fração de ésteres metílicos derivados de ácidos sequiterpanóicos bicíclicos através do íon-fragmento m/z 123 revelou a presença de uma série homóloga a partir de 30 dias de biodegradação e o aumento da abundância relativa com o progresso da biodegradação. Estes compostos não foram detectados na amostra controle [Figura 99].

A presença de bicíclicos em petróleo é bastante questionada. Alexander *et al.* (1984) sugerem que eles sejam produtos da degradação de terpanos tricíclicos e hopanos, enquanto no trabalho de Zhusheng *et al.* (1990) é sugerido que a presença desses compostos em óleos biodegradados se deve a sua alta resistência.

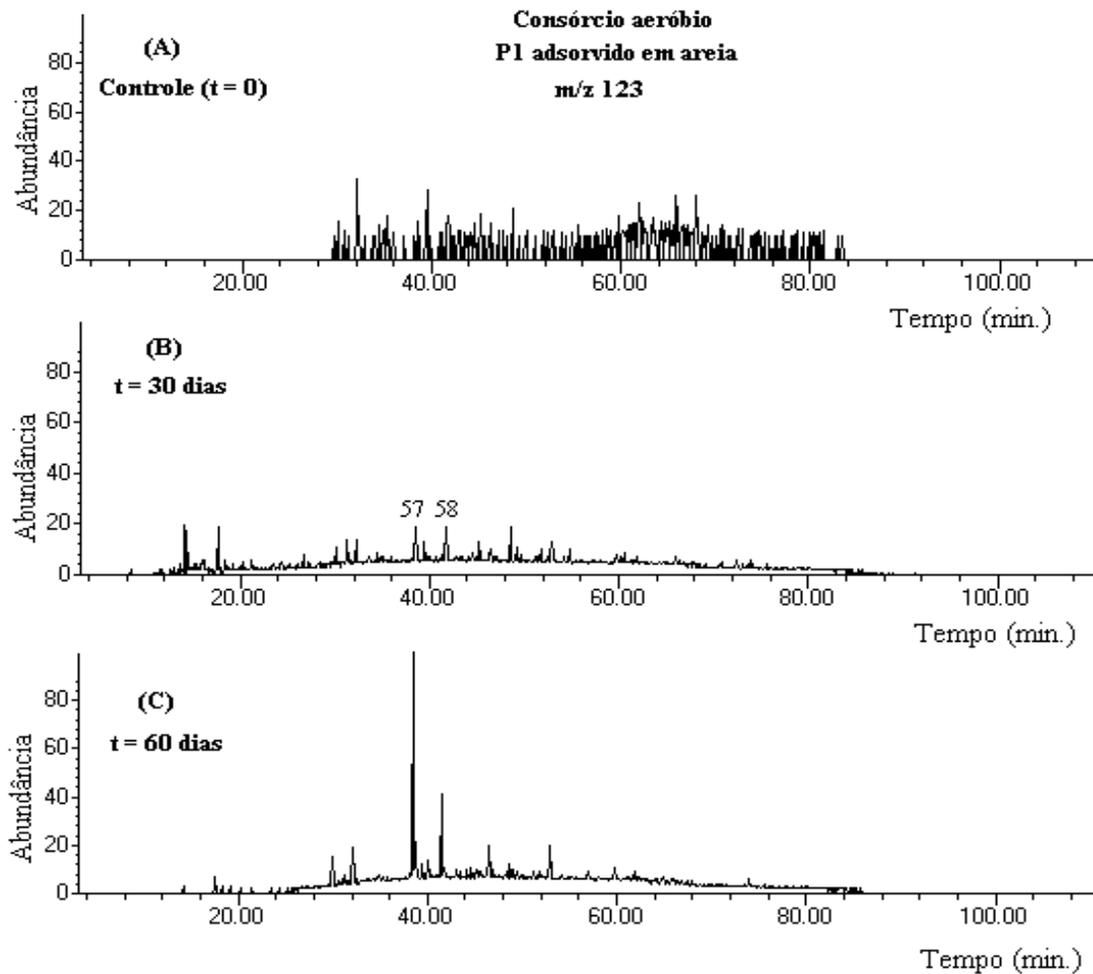


Figura 99. RIC m/z 123 obtido da análise por CG-EM da fração FEM das amostras obtidas no ensaio aeróbio com P1 adsorvido em areia.

Como não foi feita coinjeção com padrões sintéticos não foi possível confirmar a estrutura desses ácidos bicíclicos, porém, baseado no trabalho de Rebouças (1992) e na fragmentação do espectro de massas [Figura 100], sugere-se a estrutura com esqueleto tipo homodrimano e o grupo carbometóxi ligado ao carbono C_8 para os picos 57 e 58.

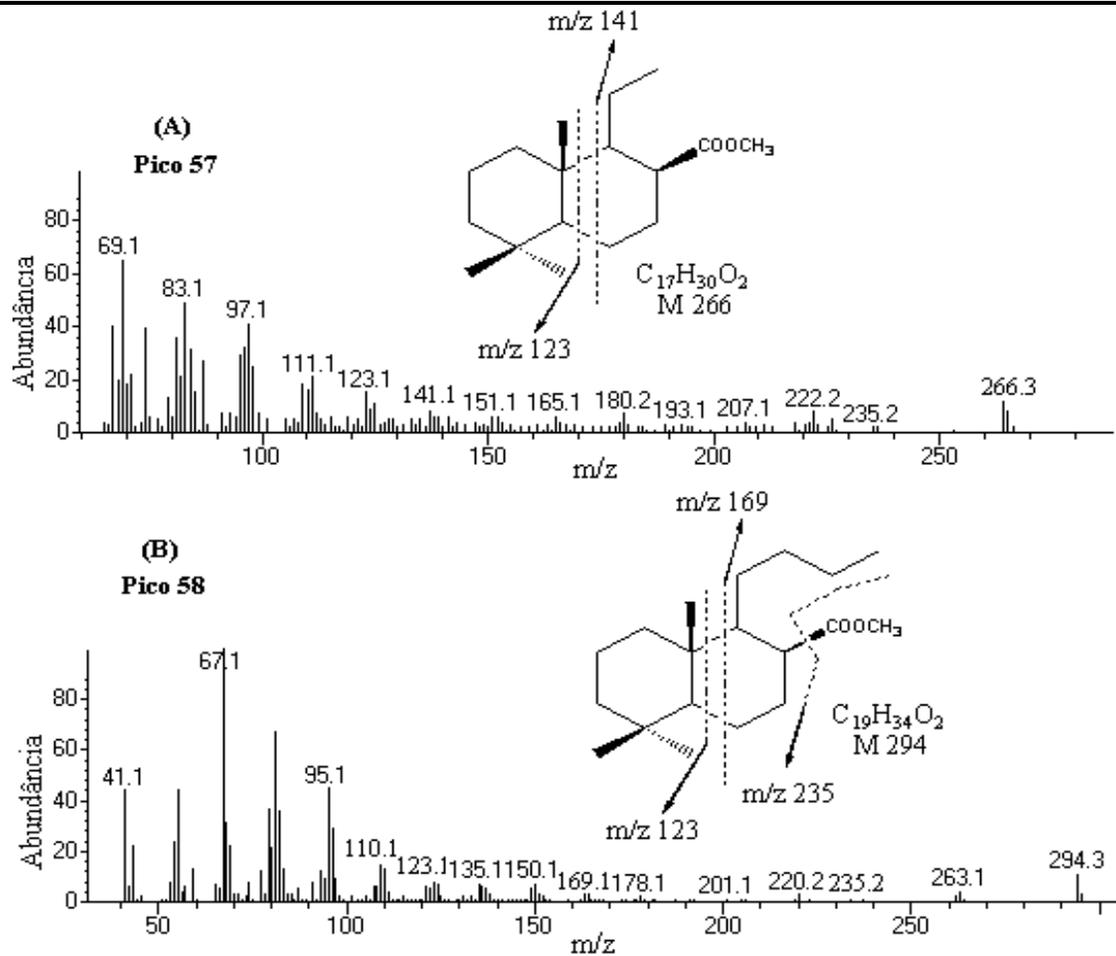


Figura 100. Espectros de massas e estruturas sugeridas para os ésteres metílicos derivados de ácido bíclicos (A) pico 57 e (B) pico 58, detectados nas amostras obtidas do ensaio com consórcio aeróbio Co1 e P1 asdorvido em areia.

Para o estudo dos ácidos terpanóicos tricíclicos também não foi feito coinjeção com padrões sintéticos, porém baseado no trabalho de Da Silva (2008) e através da análise do íon-fragmento em m/z 191 sugere-se a presença de ácidos terpanóicos tricíclicos saturados e aromáticos com o grupo carboxílico presente nos anéis C e A, respectivamente, para os **picos 59 e 60** como mostram as **Figuras 101 e 102**.

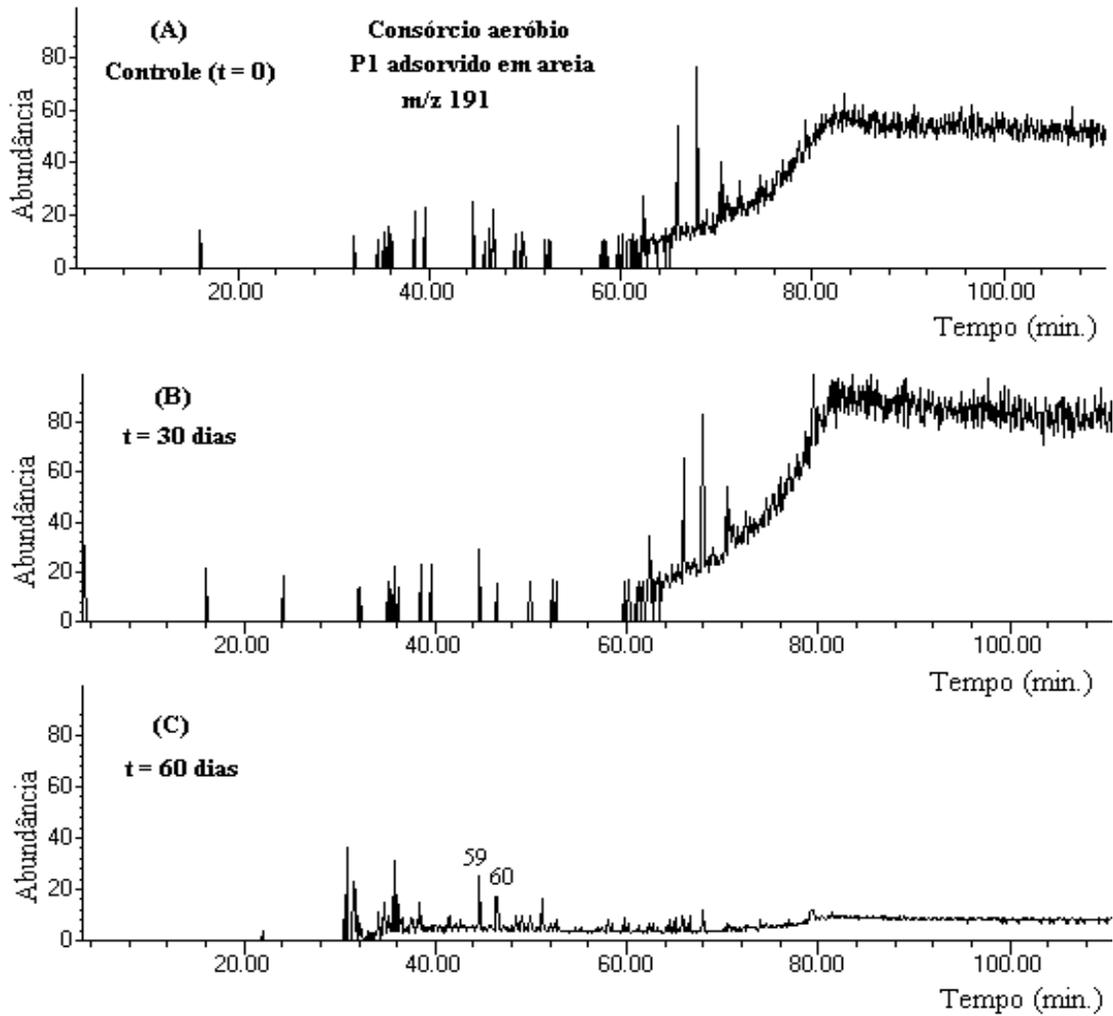


Figura 101. RIC m/z 191 obtido da análise por CG-EM da fração FEM das amostras obtidas no ensaio aeróbio com P1 adsorvido em areia.

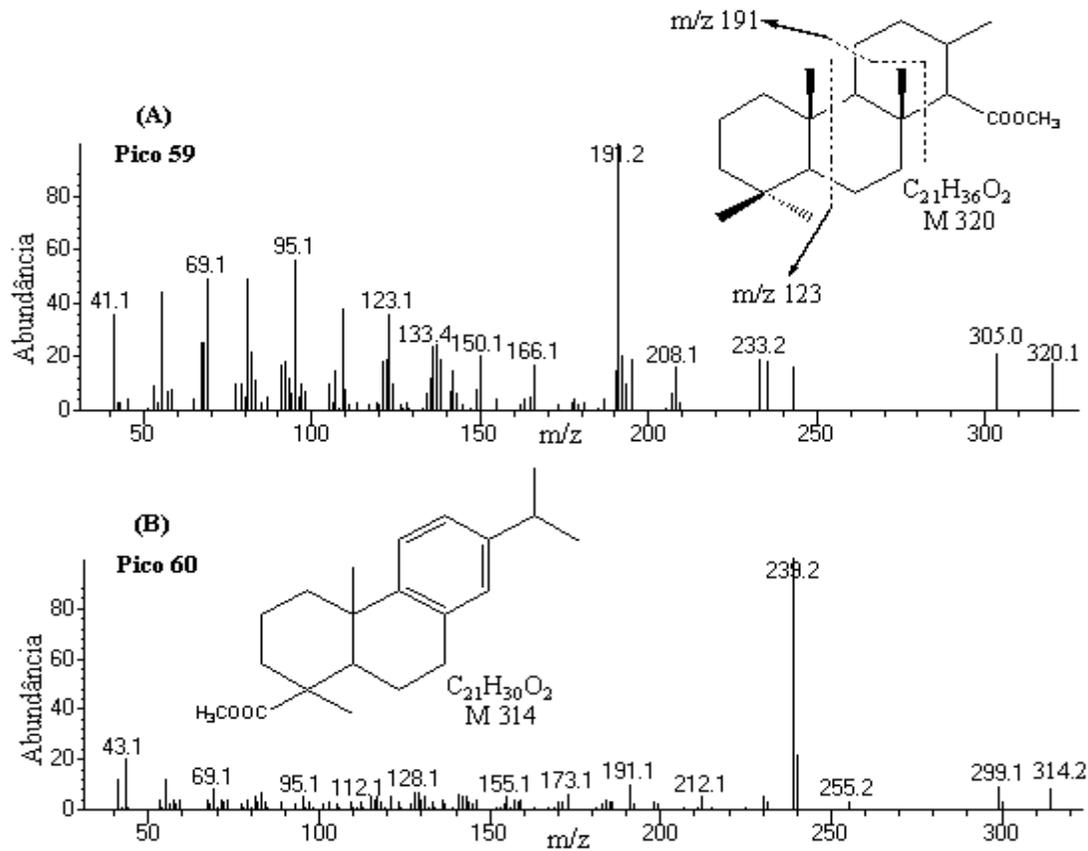


Figura 102. Espectros de massas e estruturas sugeridas para os ésteres metílicos derivados de ácidos terpanóicos tricíclicos (A) pico 59 e (B) pico 60, detectados nas amostras obtidas do ensaio com consórcio aeróbio Co1 e P1 adsorvido em areia.

Utilizando a técnica de varredura de íons totais por CG-EM não foi possível detectar a presença de ácidos hopanóicos e esteranóicos nas amostras estudadas. Estas amostras estão sendo analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas utilizando ionização por eletrospray (LC-MS) e os resultados serão futuramente submetidos à revistas científicas apropriadas.

3.3 CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DOS BIOSSURFACTANTES

Neste capítulo fez-se a caracterização e determinação das propriedades tensoativas dos biossurfactantes produzidos pelos microrganismos aeróbios.

3.3.1 DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA E EPS PRODUZIDOS

Nossos experimentos utilizando os consórcios aeróbios, apresentaram as maiores taxas de biodegradação do petróleo com emulsificação do óleo no meio Zinder levantando a questão sobre a possibilidade destes microrganismos produzirem substâncias capazes de emulsificar o petróleo. Estas substâncias, conhecidas como biossurfactantes ou substâncias exopoliméricas (EPS), tem capacidade de dispersar o petróleo tornando-o miscível em meio aquoso através da redução da tensão superficial da água e possibilitando sua degradação pelos microrganismos locais (Christofi e Ivshina, 2002).

Como os microrganismos possuem preferências metabólicas diferenciadas para degradar os constituintes do petróleo, resolveu-se utilizar diferentes fontes de carbono para estimular a produção dos biossurfactantes. Os substratos escolhidos pertencem a diferentes classes de compostos que estão presentes no petróleo: *n*-alcanos, aromáticos e ácidos.

Após 5 dias de ensaio, observou-se a produção de biossurfactantes com os substratos [9] glicose, [10] 9,10 diidrofenantreno, [11] nonadecano, [12] ácido nonadecanóico e [13] mistura de [10], [11] e [12] e após 10 dias houve produção com os substratos [14] P1 e [15] P2. A **Tabela 45** apresenta o rendimento em miligramas de EPS total produzido por grama de células dos consórcios Co1 e Co2, frente aos

diferentes substratos avaliados. Calculou-se o rendimento total de EPS produzidos através da relação entre a massa de EPS e a biomassa dos consórcios de acordo com a **Equação 1:**

$$\text{Equação 1: } \frac{\text{mg EPS produzido}}{\text{g de células}} = 2 \times \left[\frac{\text{EPS seco}}{\text{biomassa seca}} \right]$$

Tabela 45. Produção de EPS por consórcios aeróbios provenientes de petróleo brasileiro

Consórcios avaliados	Produção de EPS (mg / g células) ^a						
	Fontes de Carbono						
	9	10	11	12	13	14	15 ^b
Co1	21,00	200,81	316,23	215,86	415,47	208,80	57,61
	± 0,22	± 0,41	± 0,20	± 0,31	± 0,23	± 0,51	± 0,19
Co2	22,00	222,12	182,14	124,75	316,68	288,29	116,02
	± 0,16	± 0,13	± 0,21	± 0,15	± 0,18	± 0,19	± 0,14

^aMédia dos valores em triplicata; desvio padrão (n = 3).

^b(diidrofenantreno + nonadecano + ácido nonadecanóico).

Os resultados apresentados na **Tabela 45** mostram que os consórcios foram capazes de produzir biossurfactantes com todas as fontes de carbono utilizadas, evidenciando que a produção de EPS varia com o tipo de substrato e com os microrganismos presentes no meio. Vários trabalhos na literatura também citam que a composição do meio mineral influencia na produção do biopolímero (Banat, 1995; Abalos *et al.*, 2001).

A fonte potencial para produção de EPS por estes consórcios foi o petróleo não-biodegradado, P1 com uma concentração máxima de 415, 47 mg EPS/g de células com Co1 e de 316,68 mg EPS/g de células com Co2 ambos após 10 dias de incubação. Isto mostra que os biossurfactantes produzidos por estes microrganismos contribuem para

aumentar a biodegradação de um petróleo rico em parafinas (P1), diminuindo seu valor comercial.

3.3.2 PERFIL DE CRESCIMENTO DOS CONSÓRCIOS

O monitoramento do aumento da densidade celular dos consórcios na presença dos substratos avaliados, exceto glicose, foi realizado através de medidas espectrofotométricas de absorvância relativa dos meios reacionais no comprimento de onda de 450 nm (Johnsen *et al.*, 2002), durante cinco e em 10 dias. O aumento da turbidez, e consequente aumento dos valores de absorvância foram indicativos do incremento da biomassa nos meios. Com 10 dias de monitoramento não se observou crescimento significativo de biomassa, a qual se manteve constante. As **Figuras 103 e 104** apresentam as curvas de crescimento microbiano dos consórcios 1 e 2 frente aos substratos avaliados.

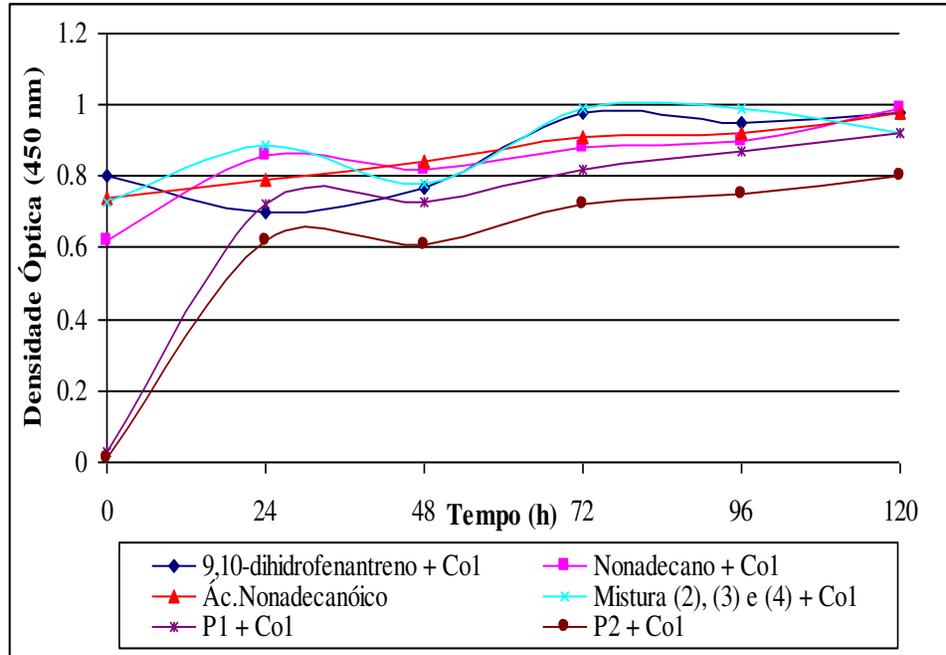


Figura 103. Curvas de crescimento do Co1 frente aos substratos avaliados.

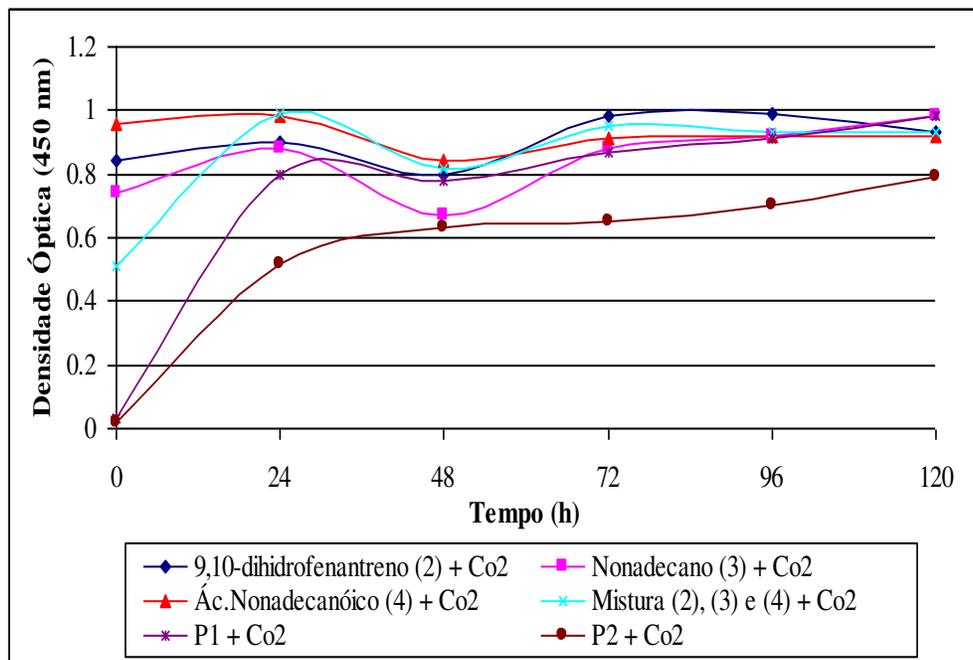


Figura 104. Curvas de crescimento do Co2 frente aos substratos avaliados.

Segundo Rahman *et al.*, (2003), quando a densidade óptica (DO) encontra-se na faixa de 0,21 a 0,40 considera-se que os microrganismos apresentam baixa densidade celular, de 0,41-0,60 corresponde a uma densidade celular moderada, de 0,61-0,80 é equivalente à alta densidade celular e quando a DO está na faixa de 0,81-1,00 significa que houve um excelente crescimento microbiano no meio. Baseado nisto pode-se notar pelas **Figuras 107 e 108** que os consórcios avaliados apresentaram excelentes crescimentos após 72 h de produção de biossurfactante para todas as fontes de carbono utilizadas com exceção do petróleo biodegradado P2. Estes dados mostram que não existe uma relação direta entre a produção de biossurfactante e o aumento da densidade celular, visto que houve pouca produção de EPS com a mistura de substratos (57,61 mg EPS/g de células) com o Co1, no entanto houve um excelente crescimento celular do Co1 com esta mistura de substrato.

Neste mesmo trabalho (Rahman *et al.*, 2003), os autores também não observaram relação direta entre produção de EPS e aumento da densidade celular. O consórcio de bactérias que eles avaliaram, utilizando petróleo como fonte de carbono, apresentou excelente crescimento celular (6,5 g de biomassa/L), porém baixa produção de EPS (4,9 g/L). A maioria dos trabalhos reportados na literatura mostra uma relação direta entre estas duas variáveis quando se utiliza bactérias isoladamente. Este fato pode ser explicado porque em consórcio existe uma competição entre os microrganismos pelo mesmo substrato, o que não ocorre quando se utiliza apenas uma bactéria.

3.3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES (EPS)

3.3.3.1 Teor de Carboidratos, Proteínas e Ácidos urônicos

Após a quantificação, realizou-se análises colorimétricas quanto aos teores de carboidratos (Dubois *et al.*, 1956), proteínas (Bradford, 1976) e ácidos urônicos (Blumenkratz & Asboe-Hansen, 1973) para caracterização dos EPS produzidos pelos

consórcios. A determinação da concentração de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos foram baseados na comparação dos valores de absorvância obtidos a partir de curvas de calibração utilizando soluções de glicose, albumina de soro bovino (BSA) e ácido galacturônico a 490, 595 e 520 nm, respectivamente (*parte experimental, seção 4.8.4, págs. 284, 285 e 286*). As medidas foram realizadas em triplicata. A **Tabela 46** mostra estes resultados expressos em miligrama de carboidratos, proteínas e ácidos urônicos por mililitro de meio de cultura dos biossurfactantes obtidos.

Tabela 46. Composição química dos EPS (mg/mL) produzidos por microrganismos aeróbios provindos de petróleo brasileiro utilizando diferentes fontes de carbono

Fontes de Carbono	Composição Química (mg/mL) ^a					
	Carboidratos		Proteínas		Ácidos Urônicos	
	Co1	Co2	Co1	Co2	Co1	Co2
Diidrofenantreno	53,73	18,87	31,18	33,69	5,10	2,89
	± 1,27	± 1,35	± 0,95	± 0,68	± 0,17	± 1,18
Nonadecano	65,12	38,99	26,57	33,30	5,58	3,78
	± 1,61	± 1,01	± 0,24	± 0,13	± 0,23	± 1,16
Ac.Nonadecanóico	24,94	30,28	27,66	37,81	4,49	3,66
	± 1,02	± 1,16	± 0,87	± 0,45	± 0,38	± 0,12
P1	56,31	35,60	30,65	28,33	2,17	2,97
	± 0,90	± 0,97	± 0,56	± 0,72	± 0,22	± 0,29
P2	22,55	33,21	19,24	36,92	2,86	2,65
	± 1,21	± 0,82	± 0,78	± 0,82	± 0,21	± 0,18
Mistura^b	71,36	21,52	22,53	29,74	6,05	4,03
	± 0,89	± 1,23	± 0,58	± 0,65	± 0,10	± 0,16

^aMédia dos valores em triplicata; desvio padrão (n = 3).

^b(diidrofenantreno + nonadecano + ácido nonadecanóico).

De acordo com a **Tabela 46** nota-se que os EPS produzidos pelos consórcios são constituídos principalmente de carboidratos e proteínas, independente da fonte de carbono utilizada. O maior conteúdo de carboidratos para Co1 foi quando se utilizou a mistura de substratos correspondendo a 71,36 mg/mL e para o Co2 foi frente ao nonadecano como fonte de carbono (38,99 mg/mL). Banat (1995) e Sutherland (2001) demonstraram que especificidade e a composição química do biossurfactante são fortemente influenciadas pela composição do meio de cultura e condições ambientais na qual a bactéria cresce. Além disso, é importante destacar que o tipo de microrganismo, se isolado ou em consórcio, também altera as características químicas do biopolímero. Martínez-Checa *et al.*, (2007) avaliando a produção de EPS por culturas isoladas de *Halomonas eurihalina* observou que eles apresentavam baixo conteúdo de carboidratos e proteínas e alto conteúdo de ácidos urônicos e sulfatos, contrário ao que foi observado neste trabalho, onde os consórcios apresentaram alto conteúdo de carboidratos e proteínas e baixo conteúdo de ácidos urônicos.

3.3.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS BIOSSURFACTANTES (EPS)

A biossíntese de biossurfactantes produzidos por uma grande variedade de bactérias foi reportada e os principais representantes desta classe de compostos são ramnolipídeos e lipídeos sulfurosos (Zhou & Kosaric, 1995).

A análise no infravermelho (IV) dos biossurfactantes produzidos pelos consórcios aeróbios revelou uma mistura de compostos que apresentaram uma banda indicativa de OH e de ligação N-H/C-H de proteínas em 3498 e 3422 cm^{-1} , respectivamente. Vibrações assimétricas de $\text{CH}_2/\text{C-H}$ foram observadas em 2928 e 2861 cm^{-1} , confirmando a presença de alcanos. Além disso, observou-se deformações de CH em 877 cm^{-1} . A banda em 1650 cm^{-1} é característica de carbonila e a banda em 1547 cm^{-1} é característica de ligação C-O [**Figura 105**].

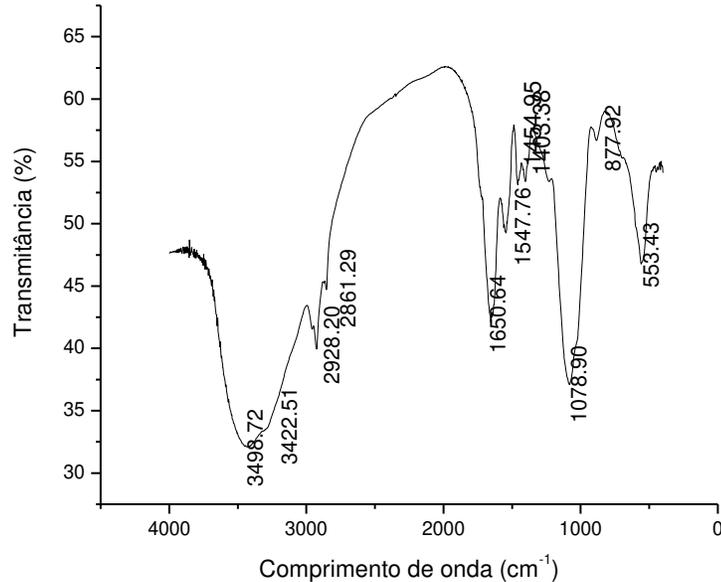


Figura 105. Espectro de infravermelho da mistura de biossurfactantes produzida pelo consórcio aeróbio.

As informações obtidas a partir da análise no infravermelho são indicativas da presença de um ou mais biossurfactantes com natureza glicolipopeptídica. Os surfactantes lipoprotéicos, incluindo surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina e bacilomicina, produzidos por espécies de *Bacillus* são talvez os mais conhecidos por suas atividades antibióticas (Maier, 2003 ; Steller & Valter, 2000). Esses compostos se caracterizam pela presença de peptídeos ligados a ácidos graxos com os aminoácidos dispostos em uma estrutura cíclica (Maier, 2003).

Para complementar as informações sobre a natureza química dos biossurfactantes produzidos pelos consórcios aeróbios aqui avaliados, realizou-se espectrometria de massas de alta resolução por infusão direta utilizando ionização por eletrospray (MS/ESI). Devido à característica glicolipopeptídica observada pelo IV, inicialmente fez-se a análise de um padrão de surfactina fornecido pela doutoranda Carla Porto. O objetivo foi comparar o perfil espectral do padrão com a nossa mistura.

A surfactina [Figura 106] é produzida principalmente por *Bacillus subtilis* (Kowall *et al.*, 1998) e sua estrutura geral é a de um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidroxi que pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, o que permite a existência de diferentes isoformas que se diferenciam ligeiramente em suas propriedades físico-químicas devido a variações no tamanho da cadeia, à ligação do hidroxi ácido graxo e a substituição dos aminoácidos que compõem o anel (Kowall *et al.*, 1998; Lang, 2002; Hsieh *et al.*, 2004).

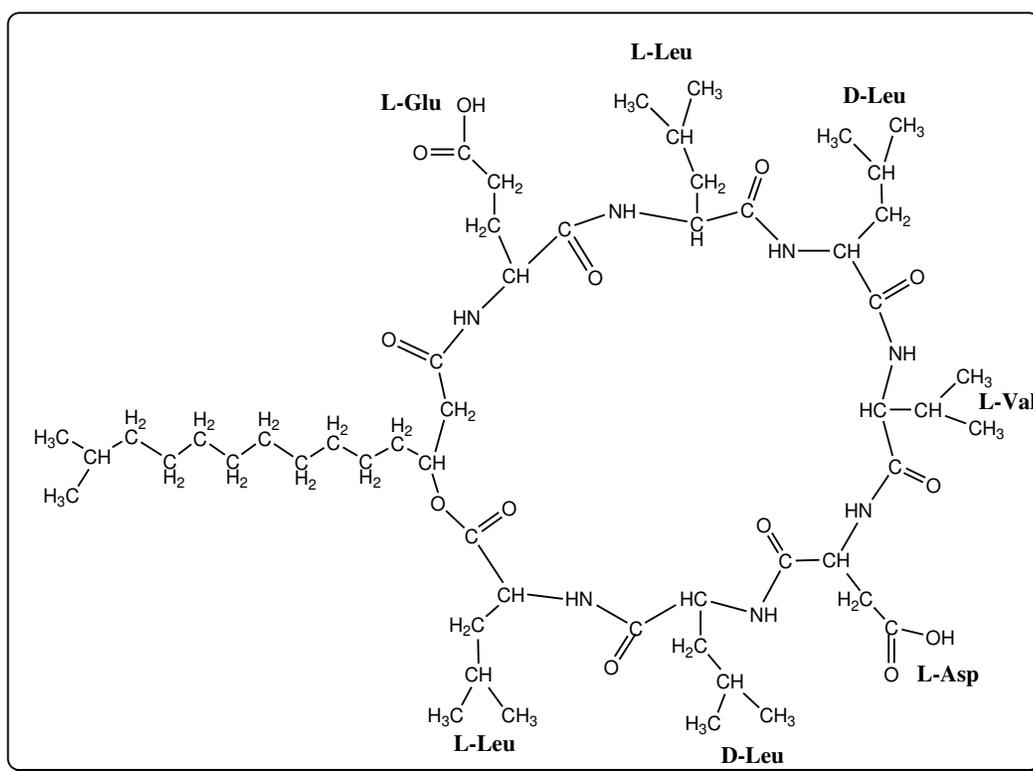
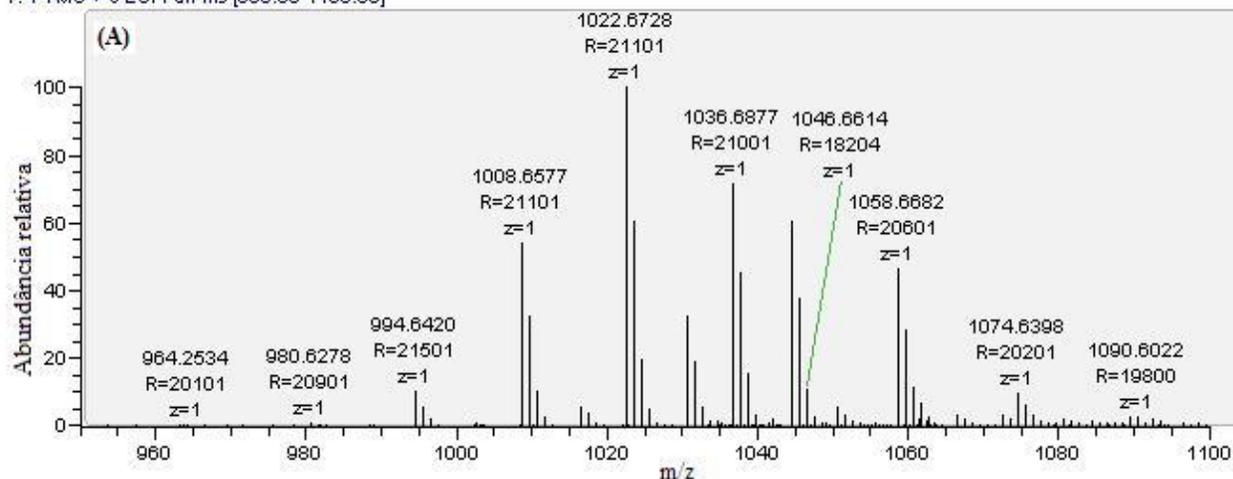


Figura 106. Estrutura de uma isoforma da surfactina.

A **Figura 107** apresenta o cromatograma total de íons do padrão e da mistura analisada no modo íon positivo por MS/ESI.

surfactina #449 RT: 4.75 AV: 1 NL: 2.05E6
T: FTMS + c ESI Full ms [950.00-1100.00]



surfactina_amostra_10-6 #401 RT: 4.29 AV: 1 NL: 4.44E4
T: FTMS + c ESI Full ms [950.00-1100.00]

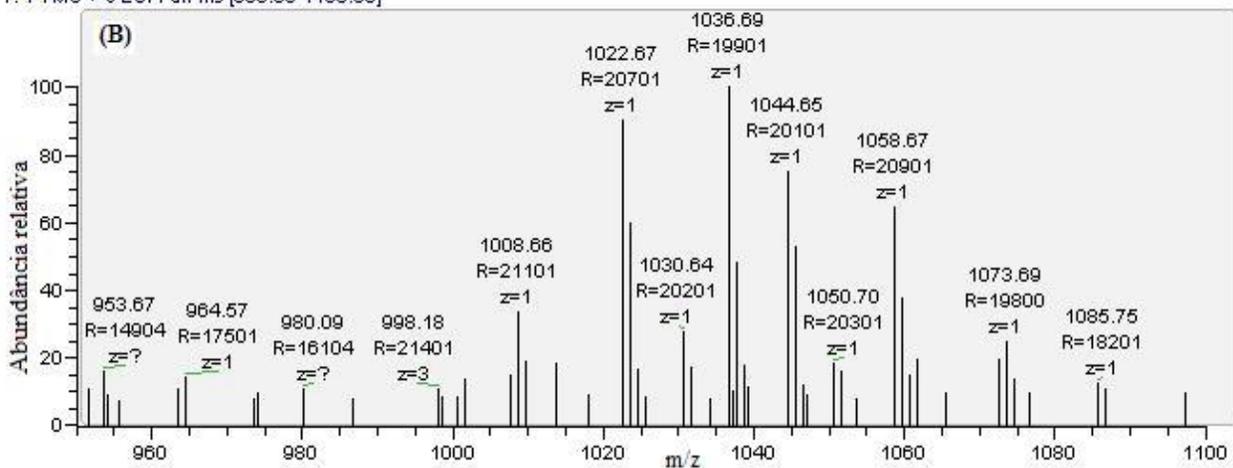


Figura 107. Espectro de massas da (A) surfactina e do (B) biossurfactante produzido pelo consórcio aeróbio após 5 dias de incubação.

O espectro do padrão de surfactina (A) mostra a distribuição de uma série homóloga que varia em uma unidade de CH_2 caracterizando a presença de isoformas que apresentam diferenças na cadeia lateral. No espectro da amostra (B) também se observa esta série homóloga com diferenças apenas na abundância relativa de cada isoforma. Apesar da semelhança entre o padrão e a mistura obtida, não foi possível determinar com exatidão os aminoácidos e a ordem que eles aparecem na estrutura. Mesmo assim, com estes resultados pode-se sugerir que a amostra analisada é

constituída de diferentes isoformas de surfactina ou que pelo menos este é o componente principal.

3.3.5 PROPRIEDADES DOS BIOSSURFACTANTES (EPS)

As propriedades tensoativas, tais como, tensão superficial (TS) e interfacial (TI), concentração micelar crítica (CMC) e índice de emulsificação (E), são importantes parâmetros usados extensivamente para medir a eficiência dos biossurfactantes na solubilização de compostos insolúveis em meios aquosos (Desai e Banat, 1997; Mulligan, 2005; Singh 2007). Dentre estes, utilizou-se a medida da tensão superficial e o índice de emulsificação para avaliar a eficiência dos biossurfactantes obtidos pelos Co1 e Co2 na solubilização dos diferentes substratos empregados.

3.3.5.1 Medida da Tensão Superficial (TS)

Mediu-se a tensão superficial e interfacial do sobrenadante que continha os EPS com um tensiômetro D-Nouy (*parte experimental, seção 4.8.5.1, pág. 290*). Para medir a TS usou-se as relações ar/água e ar/meio Zinder como controle. As **Figuras 108 e 109** ilustram estes resultados para os consórcios Co1 e Co2, respectivamente.

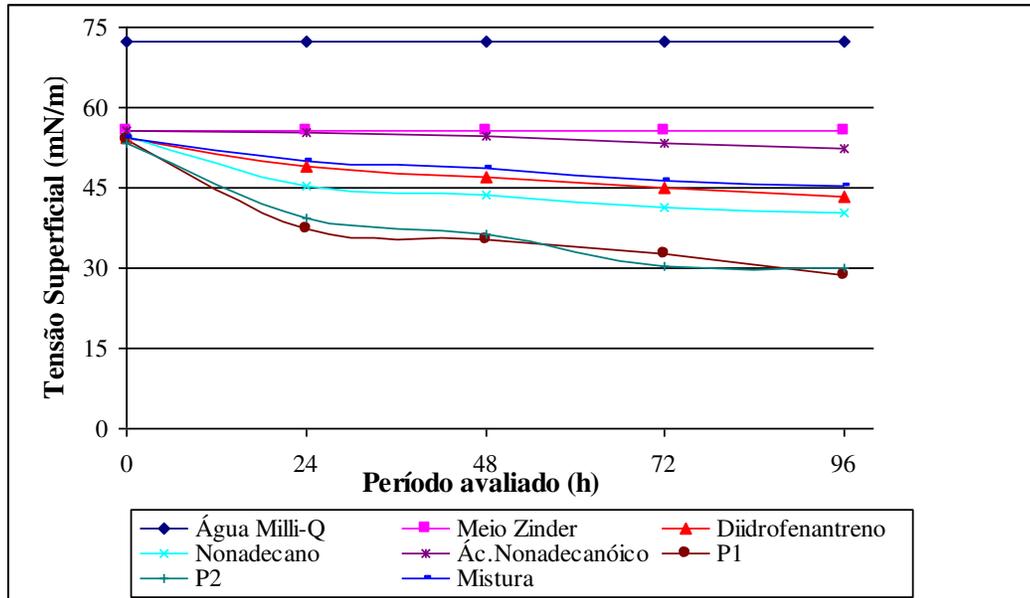


Figura 108. Medida de Tensão Superficial para Co1.

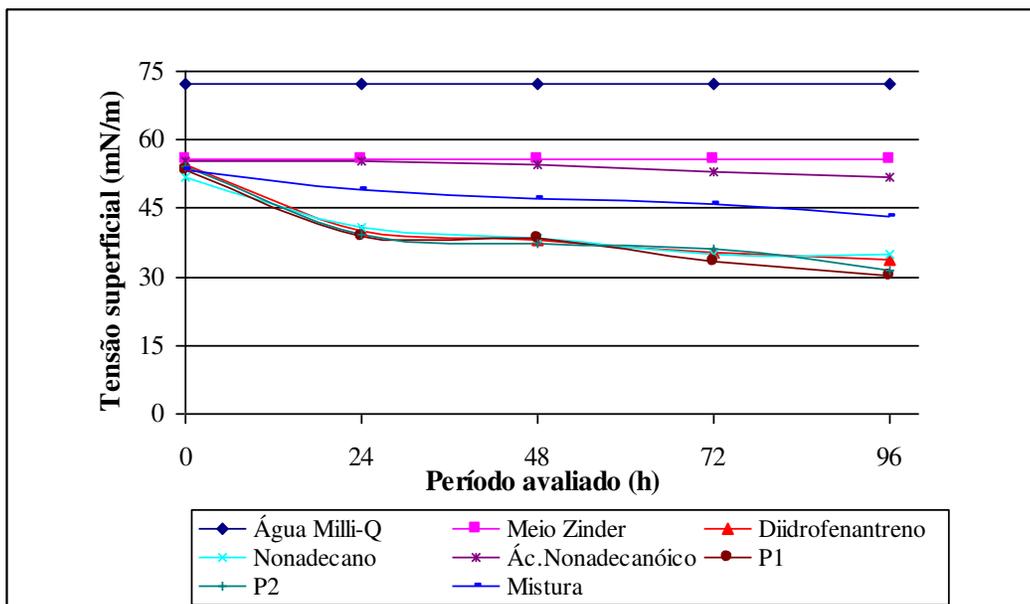


Figura 109. Medida de Tensão Superficial para Co2.

O Co1 produziu 415,47 mg de EPS/g de células utilizando P1 como substrato e reduziu a TS da água e do meio Zinder de 72,36 e 55,71 mN/m, respectivamente, para 28,57 mN/m. Utilizando P2 como fonte de carbono, este mesmo consórcio produziu

208,80 mg EPS/g de células e apresentou redução da TS da água e do meio Zinder para 30,12 mN/m. O Co2 apresentou redução da TS de forma semelhante quando P1, P2 e 9,10-diidrofenantreno foram usados como substrato. A concentração de EPS no meio foi de 316,68, 288,29 e 222,12 mg EPS/g de células e a TS da água e do meio Zinder foram reduzidas para 30,42, 31,24 e 33,73 mN/m, respectivamente. A partir desses resultados nota-se que com Co1 houve maior redução da tensão superficial para o substrato que foi maior produtor de EPS, enquanto que o Co2 não apresentou esta seletividade para três dos substratos utilizados.

Rahman *et al.*, (2003), relatou que um consórcio formado por bactérias dos gêneros *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Flavobacterium* sp. e *Pseudomonas* sp., produziu 4,9 g/L de biossurfactante e reduziu a TS da água de 72 mN/m para 34,1 mN/m, enquanto que os mesmos microrganismos avaliados isoladamente produziram 1,3, 2,1, 4,1, 1,3 e 7,5 g/L de biossurfactante e reduziram a TS para 32,9, 31,6, 36,4, 36,1 e 29,4 mN/m, respectivamente. Estes resultados mostram a influência do tipo de microrganismos nas propriedades tensoativas do biossurfactante, uma vez que isoladamente os microrganismos apresentaram menor produção do biopolímero e reduziram a TS de forma semelhante ao consórcio. No nosso trabalho, observou-se que existe uma relação direta entre a concentração de EPS produzido e a redução da TS para o Co1, ou seja, quanto maior a produção de EPS maior a redução da TS.

3.3.5.2 Medida do Índice de Emulsificação (E)

Para avaliar o poder de emulsificação dos biossurfactantes calculou-se o índice de emulsificação (*E*) do sobrenadante. Os valores de *E* foram expressos após 24h de repouso como percentagem do peso total ocupado pela emulsão de acordo com a **Equação 2**.

$$\text{Equação 2: } E \% = \left[\frac{\text{altura da camada emulsionada (cm)}}{\text{altura total do líquido (cm)}} \right] \times 100$$

A **Tabela 47** apresenta a porcentagem da atividade de emulsificação dos consórcios avaliados utilizando-se diferentes hidrocarbonetos. Os resultados foram comparados com a atividade de emulsificação para o surfactante sintético Tween 80.

Tabela 47. Atividade emulsificante ($E_{24}\%$) de EPS produzidos por Co1 e Co2 e surfactante químico (Tween 80) em tolueno, *n*-octano e diesel.

Emulsificantes	Hidrocarbonetos		
	Tolueno	<i>n</i> -Octano	Diesel
Nonadecano (Co1)-EPS	28 ± 3	43 ± 2	32 ± 6
Nonadecano (Co2)-EPS	25 ± 1	60 ± 5	25 ± 3
Ac.Nonadecanóico (Co1)-EPS	5 ± 5	18 ± 3	12 ± 4
Ac.Nonadecanóico (Co2)-EPS	36 ± 3	21 ± 1	10 ± 5
9,10-Diidrofenantreno (Co1)-EPS	70 ± 1*	47 ± 1	4 ± 2
9,10-Diidrofenantreno (Co2)-EPS	62 ± 2	42 ± 2	5 ± 2
Mistura (Co1)-EPS	30 ± 1	54 ± 3	13 ± 2
Mistura (Co2)-EPS	21 ± 4	53 ± 1	9 ± 1
P1 (Co1)-EPS	41 ± 4	61 ± 1	7 ± 3
P1 (Co2)-EPS	32 ± 2	35 ± 3	7 ± 2
P2 (Co1)-EPS	23 ± 3	45 ± 4	5 ± 2
P2 (Co2)-EPS	19 ± 1	23 ± 2	6 ± 1
Tween 80	40 ± 1	51 ± 2	39 ± 1

*Valores em negrito: maior atividade emulsificante que Tween 80 (surfactante químico).

O índice de emulsificação depois de 24 h foi mais elevado para o tolueno ($E = 70\%$) utilizando 9,10-diidrofenatreno como fonte de produção do EPS. Quando se

comparou a atividade emulsificante para o Tween 80, observou-se que os EPS produzidos pelo Co1 com P1, pelo Co2 com nonadecano e por ambos os consórcios com 9,10-diidrofenantreno e a mistura de substratos, apresentaram uma melhor emulsificação (variando de 41 a 70 %), que o surfactante químico quando se utilizou tolueno e octano. Quando se usou diesel, a maior emulsificação (32 %) foi com o EPS produzido pelo Co1 com nonadecano. Os resultados obtidos por Rahman *et al.*, (2003) mostram que o consórcio avaliado apresentou 53, 66 e 5 % de emulsificação quando eles usaram benzeno, hexano e diesel, respectivamente como hidrocarbonetos.

Nossos resultados demonstram a excelente capacidade emulsificante que os EPS produzidos pelos consórcios aeróbios possuem com os hidrocarbonetos testados, mostrando a viabilidade do seu desenvolvimento para diferentes aplicações, notadamente ambientais (Nitschke *et al.*, 2005).

3.3.6 BIODEGRADAÇÃO X PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES(EPS)

Além de verificar a produção, caracterização e propriedades tensoativas dos EPS, fez-se a correlação entre os EPS produzidos e a biodegradação dos substratos 9,10-diidrofenantreno, nonadecano, ácido nonadecanóico, P1 e a mistura, uma vez que o crescimento de microrganismos utilizando-se hidrocarbonetos é frequentemente associado à produção de compostos que podem emulsificá-los, tornando-os mais acessíveis ao metabolismo microbiano (Calvo *et al.*, 2004). Além disso, em consórcios ocorrem associações naturais entre as comunidades microbianas presentes que atuam tanto na produção de substâncias exopoliméricas, durante a formação de biofilmes, quanto nos processos de biodegradação. Para isso, foram realizadas análises por CG-EM para determinar as taxas de biodegradação (%) dos substratos avaliados. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 48**.

Tabela 48. Taxas de biodegradação dos substratos avaliados pelos consórcios bacterianos.

Consórcios avaliados	Taxas de biodegradação (%)				
	Substratos avaliados				
	9,10- Diidrofenantreno	Nonadecano	Ácido Nonadecanóico	Mistura ^a	P1
Co1	53 ± 1,21	98 ± 0,12	51 ± 0,05	72 ± 1,20	42 ± 1,75
Co2	51 ± 0,10	63 ± 0,82	54 ± 1,02	96 ± 0,16	35 ± 1,98

^a(9,10-diidrofenantreno + nonadecano + ácido nonadecanóico).

As fontes de carbono preferenciais para maior produção de EPS [Tabela 45] não foram às mesmas escolhidas pelos consórcios para maior degradação [Tabela 48], porém, todos os compostos apresentaram taxas acima de 50 % (exceto P1), mostrando que em consórcios alguns microrganismos são potenciais produtores de EPS, enquanto outros são excelentes biodegradadores.

Com estes resultados foi possível observar que a produção de EPS pelos consórcios aeróbios presentes nos reservatórios auxilia os processos de biodegradação do petróleo, o que pode justificar as maiores taxas de biodegradação para os experimentos realizados com os aeróbios, em comparação aos anaeróbios.

4.PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES EMPREGADAS

4.1.1 SOLVENTES, REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

Os reagentes, solventes e meios de cultura utilizados neste trabalho foram analiticamente puros e/ou indicados pelos fabricantes para uso em diferentes análises. Quando necessário os reagentes e solventes foram purificados antes do uso seguindo métodos descritos na literatura (Perrin et al., 1980). Os meios de cultura foram submetidos à esterilização em autoclave a 121 °C e pressão de 1 atm, por 20 minutos. A vidraria foi adequadamente limpa e esterilizada em autoclave a 121 °C, 1 atm por 30 minutos ou em estufa de esterilização a 180 °C durante 1 hora. Todo material que não pôde ser esterilizado em autoclave foi submetido à radiação UV durante 30 minutos, antes de seu uso. Utilizou-se água Milli-Q no preparo de todas as soluções utilizadas neste trabalho.

Todos os ensaios realizados sob condições aeróbias foram manipulados em câmaras de fluxo laminar, e os realizados sob condições anaeróbias foram manipulados utilizando-se uma linha de gases, sob fluxo positivo de N₂.

4.1.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA

As cromatografias em coluna foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 da Merck, granulometria de 70-230 mesh e gradientes de solventes purificados como eluentes. A sílica foi previamente tratada com clorofórmio e ativada em estufa a 70 °C durante 1 h para eliminar possíveis impurezas. A relação entre a amostra e o adsorvente,

os eluentes utilizados e o volume de alíquota recolhidos variaram de acordo com cada experimento.

4.1.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se filmes sobre cela de KBr, empregando-se um espectrofotômetro Bomem MB Modelo B-100 resolução de 4 cm^{-1} e 1660 FTIR.

4.1.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV-Vis)

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro com arranjo de diodos Modelo HP 8452A.

4.1.5 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de fluorescência das reações de triagem enzimática de alto desempenho foram realizadas em um leitor de fluorescência *Flashscan 530 Analytic Jena*, utilizando filtro de excitação de $\lambda_{\text{ex}} = 365\text{ nm}$ e leitura de emissão à $\lambda_{\text{em}} = 460\text{ nm}$.

4.1.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas em cromatógrafo Hewlett Packard 5890II, acoplado a um detector seletivo de massas HP5970-MSD, operando com uma fonte de elétrons com energia de ionização de 70 eV.

O cromatógrafo é equipado com um injetor tipo split/splitless e com coluna capilar de sílica do tipo MDN5S (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), cuja fase estacionária consiste de 5% de fenil metil silicone. As amostras foram adequadamente diluídas e o volume de 1 μL foi usado nas injeções, utilizando-se hélio como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector variaram conforme o método utilizado. O espectrômetro de massas operou com velocidade de 0,77 scans.seg.⁻¹ na faixa de m/z 40-700.

4.1.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (MS-ESI)

As análises por MS-ESI foram realizadas em um equipamento com dois analisadores de massas em série, um íon-trap linear do tipo quadrupolo (LTQ XL) e um Orbitrap de alta resolução (LTQ Orbitrap XL) da *Thermo Scientific*.

4.2 AMOSTRAS ESTUDADAS

As amostras de água de formação e de petróleo, de diferentes graus de biodegradação e profundidades, foram coletadas em maio de 2002 (coleta 1) e em julho de 2005 (coleta 2), no Campo de Pampo Sul, Bacia de Campos, RJ. A **Tabela 49** apresenta as características geoquímicas dos óleos utilizados neste estudo.

Tabela 49. Características geoquímicas das amostras de óleo utilizadas para obtenção dos consórcios microbianos

Poços	Nível de biodegradação ^a	Temperatura (° C)	Profundidade (m)	Indicadores geoquímicos de fonte ^{b,c} , biodegradação ^{a,d} e maturidade térmica ^{e,f}				
				Esterano/hopano ^b	C ₂₆ TT/ C ₂₅ TT ^c	NOR25/ H30 ^d	αββ ^e	Ts/ (Ts+Tm) ^f
1	NB (nível 1-2)	82	2405-2588	0,35	1,20	0,06	0,49	0,24
2	B (nível 5-6)	71	1988-2222	0,94	0,97	0,08	0,51	0,32
3	MB (nível 3-4)	62	3023	0,78	1,20	0,04	0,49	0,29
4	B (nível 6)	62	2066	0,86	1,19	0,88	0,43	0,39
5	NB (nível 0-1)	85	3070-3240	0,25	1,23	0,05	0,45	0,37

^a Peters e Moldowan, 1993, NB (Não biodegradada), B (Biodegradada), MB (moderadamente biodegradada).;

^b Calculado a partir das respectivas áreas em m/z 217 de C₂₇, C₂₈ e C₂₉ ααα (20R + 22S) e αββ (20R + 22S) esteranos regulares e a partir das respectivas áreas em m/z 191 de C₂₉-C₃₃ 17α(H)-hopanos (20R + 22S).;

^c Calculado a partir das respectivas áreas em m/z 191 de C₂₆ terpano tricíclico (TT) (22R + 22S) / C₂₅ terpano tricíclico (TT) (22R + 22S);

^d Calculado a partir das respectivas áreas em m/z 191 de C₂₉ 25-nor-17α(H) hopano / C₃₀ 17α,21β(H) hopano;

^e Calculado a partir das respectivas áreas em m/z 217 de C₂₉ 5α(H),14β(H),17β(H) (20R+S) 24-etilcolestano / C₂₉ 5α(H),14α(H),17α(H) (20R+S) 24-etilcolestano + C₂₉ 5α(H),14β(H),17β(H) (20R+S) 24-etilcolestano;

^f Calculado a partir das respectivas áreas em m/z 191 de C₂₇ 18α(H)-22,29,30-trisnorhopano (Ts) e C₂₇ 17α(H)-22,29,30-trisnorhopano (Tm).

As amostras de águas de formação foram coletadas em tanques de separação água/óleo à temperatura de 50 °C e as amostras de petróleo foram coletadas de diferentes poços de produção.

4.3 PREPARO DE SOLUÇÕES E MEIOS MINERAIS

As soluções e meios minerais descritos neste item foram utilizados nos enriquecimentos para obtenção dos consórcios, nos ensaios de biodegradação e no estudo sobre a investigação de exopolímeros:

➤ **Meio Zinder:** este meio foi utilizado nos enriquecimentos e ensaios aeróbios e anaeróbios. Quando se utilizou microrganismos aeróbios, o meio foi preparado pela dissolução de 0,5 g de NH_4Cl ; 0,4 g de KH_2PO_4 ; 0,1 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 10 mL de solução traço de metais em 1000 mL de água Milli-Q. O meio foi esterilizado e armazenado em frasco Schott à temperatura ambiente.

O meio Zinder utilizado para anaeróbios possui a mesma composição só que é acrescido de 1 mL de resazurina 1 % (para monitorar o potencial de óxido-redução) e submetido à troca de atmosfera de O_2 para $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (70:30) durante 20 minutos, utilizando um sistema de distribuição simultânea de gases. Este sistema possui uma coluna catalítica de BTS[®] utilizada para reter traços de oxigênio presentes na linha de condução e cilindros de gases. Após esta troca de atmosfera os frascos foram lacrados, esterilizados e armazenados à temperatura ambiente na ausência de luz.

O pH final do meio Zinder foi ajustado para 7,0 utilizando-se solução de KOH 4 mol/L.

➤ **Solução traço de metais:** dissolveu-se 4,5 g de Tritriplex III; 0,5 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de H_3BO_3 ; 0,02 g de NiCl_2 e 0,01 g de Na_2MoO_4 em 1000 mL de água Milli-Q. A solução foi esterilizada e armazenada em frasco Schott à 4 °C.

➤ **Solução de resazurina 1 %:** dissolveu-se 0,5 g de resazurina em 50 mL de água Milli-Q. A solução foi armazenada em frasco âmbar à temperatura de 4 °C.

➤ **Soluções de vitaminas:** preparou-se duas soluções de vitaminas para estimular o crescimento de microrganismos aeróbios, arqueas metanogênicas e bactérias sulfato-

reductoras. A solução para aeróbios e metanogênicas foi preparada pela dissolução de 0,002 g de biotina; 0,002 g de ácido fólico; 0,005 g de tiamina.HCl; 0,005 g de riboflavina; 0,005 g de ácido nicotínico; 0,005 g de pantotenato de cálcio; 0,010 g de piridoxina.HCl; 0,0001 g de vitamina B₁₂; 0,005 g de ácido lipóico em 1000 mL de água Milli-Q. Para o preparo da solução de vitaminas para sulfato-reductoras utilizou-se os mesmos componentes descritos anteriormente, acrescido de 0,005 g de ácido *p*-aminobenzóico também em 1000 mL de água Milli-Q. As soluções foram filtradas em membrana de 0,22 µm, distribuídas em frascos de penicilina de 50 mL e mantidas sob fluxo de N₂ por 2 minutos. Os frascos foram lacrados e armazenados à temperatura de 4 °C.

☒ **Solução de extrato de levedura 2 %:** dissolveu-se 1,0 g de extrato de levedura (Difco) em 50,0 mL de água Milli-Q. A solução foi transferida para dois frascos de penicilina de 50 mL e mantida sob fluxo de N₂ por 2 minutos. Os frascos foram lacrados, esterilizados e armazenados à temperatura ambiente na ausência de luz.

☒ **Soluções de diferentes substratos orgânicos utilizadas nos estudos de biodegradação:** preparou-se soluções de glicose, lactato de sódio, metanol, propionato e bicarbonato de sódio que foram utilizadas nos enriquecimentos e nos ensaios de biodegradação.

Para preparar a solução de glicose e propionato de sódio dissolveu-se, respectivamente, 1,8066 g e 1,9212 g em 1000 mL de água Milli-Q. O lactato de sódio foi obtido através da reação de neutralização entre ácido láctico 4 mol/L e hidróxido de sódio 4 mol/L (1:1 v/v). O pH final da solução de lactato de sódio foi ajustado para 10,0. A solução de bicarbonato de sódio foi preparada pela dissolução de 1 g do sal em 10 mL de água Milli-Q.

Para preparar a solução de metanol, inicialmente esterilizou-se em autoclave, o metanol e a água Milli-Q separadamente. Após resfriamento, misturou-se o metanol e a água Milli-Q na proporção 1:9 v/v, utilizando-se seringa estéril. As soluções de glicose,

lactato de sódio, metanol e propionato de sódio foram esterilizadas em autoclave e a solução de bicarbonato de sódio foi filtrada em membrana de 0,22 μm . Todas as soluções foram transferidas para frascos de penicilina de 50 mL sob fluxo de N_2 por 2 minutos, lacradas e armazenadas à temperatura ambiente na ausência de luz.

✂ **Soluções de substratos orgânicos utilizadas na produção de EPS:** preparou-se soluções de glicose, 9,10-diidrofenatreno, nonadecano e ácido nonadecanóico, todas à concentração de 8 mg/mL, como segue:

Para a solução de glicose, pesou-se 0,8 g de glicose e dissolveu-se em 100 mL de água Milli-Q. Transferiu-se a solução para frasco Schott, esterilizou-se em autoclave e armazenou-se à temperatura de 4 °C.

Para as soluções de 9,10-diidrofenatreno, nonadecano e ácido nonadecanóico, pesaram-se 0,16 g e dissolveu-se em 20 mL de etanol absoluto (previamente esterilizado). As soluções foram submetidas a banho de ultrassom até sua completa dissolução. Após isto transferiu-se para frascos Schott e armazenou-se à temperatura de 4 °C.

4.4 ENRIQUECIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS CONSÓRCIOS

Utilizou-se técnicas de enriquecimento microbiano com diferentes meios de cultivo para recuperar consórcios aeróbios e anaeróbios (arqueas metanogênicas e bactérias sulfato-redutoras) a partir das amostras de água de formação e petróleo coletadas.

Os meios de culturas utilizados foram:

(a) Caldo Nutriente (NB, Difco) – rico em nutrientes e utilizado como meio de cultura não seletivo;

(b) Caldo Nutriente (NB) adicionado de NaCl 3 %, para recuperar bactérias halofílicas moderadas (Quillaguamán et al., 2006);

(c) Meio mineral Zinder (Zinder et al., 1984) acrescido de soluções traço de metais, vitaminas, extrato de levedura, glicose, lactato de sódio, metanol e propionato de sódio, para estimular o crescimento de bactérias aeróbias e arqueas metanogênicas. Para bactérias sulfato-redutoras além destas soluções utilizou-se ainda, solução redutora de sulfeto de sódio e cisteína. O meio Zinder é acrescido destas soluções porque algumas bactérias presentes em ambientes extremos dependem de fontes específicas de carbono e energia para crescer.

4.4.1 OBTENÇÃO DOS CONSÓRCIOS E ISOLADOS AERÓBIOS

Os enriquecimentos foram realizados em erlenmeyers de 500 mL, contendo 360 mL de cada um dos meios de cultura citados na *seção 4.4* e 40 mL de amostras (água de formação e petróleo).

Todas as amostras de petróleo foram aquecidas em banho-maria a 50 °C durante 30 minutos antes de adicioná-las aos meios. Para a amostra P3 [**Tabela 49**, *pág. 259*] foi necessário adicionar 20 mL de Tween 80 para melhor solubilização.

Os erlenmeyers foram incubados em agitador rotacional (modelo MA-420, Marconi) 150 rpm, a 28 e 55 °C, durante 20 dias. Após este período de enriquecimento o consórcio foi centrifugado (centrífuga Harrier modelo 18/80) a 5000 g e 18 °C, para ser utilizado nos ensaios de biodegradação.

Com o intuito de isolar as bactérias presentes nas amostras e nos consórcios obtidos, adicionou-se alíquotas de 0,1 e de 1,0 mL das amostras, sem e com prévio enriquecimento, em placas de Petri contendo 20 mL de Nutriente Ágar (NA) e Marine Ágar (MA). As placas foram armazenadas em incubadora B.O.D. (modelo MA 415, Marconi) a 28 e 55 °C, durante 4 dias. Todos os experimentos de enriquecimento e isolamento foram feitos em duplicata.

A purificação das bactérias aeróbias isoladas foi realizada através de estrias em Ágar pela técnica de esgotamento. As culturas foram analisadas por suas características macroscópicas (cor e brilho), microscópicas (forma, tamanho) e por coloração de Gram (Gram-positivas e Gram-negativas). Todos os consórcios e bactérias isoladas foram enviados ao CPQBA – UNICAMP para serem submetidos a técnicas moleculares de identificação, sob supervisão da Dra. Valéria M. de Oliveira.

4.4.2 *OBTENÇÃO DOS CONSÓRCIOS ANAERÓBIOS*

Os enriquecimentos anaeróbios foram realizados em frascos de penicilina de 50 mL, contendo 30 mL dos meios citados na *seção 4.4* e 6 mL de amostra (água de formação ou petróleo) com o intuito de recuperar arqueas metanogênicas e bactérias sulfato-redutoras. Os frascos foram purgados durante 20 minutos (5 purgas de 4 minutos) utilizando-se uma seringa acoplada a uma bomba de vácuo, alternando cada purga com a injeção de N₂:CO₂ (70:30) ao meio. Os frascos foram incubados em estufa a 55 °C por 30 dias. Não se isolou os microrganismos destes consórcios, mas eles foram enviados ao CPQBA para identificação das espécies presentes através da extração total do DNA, sob supervisão da Dra. Valéria M. de Oliveira.

4.4.3 *OBTENÇÃO DOS CONSÓRCIOS MISTOS*

Para obtenção dos consórcios mistos misturou-se a biomassa obtida nos enriquecimentos aeróbios e anaeróbios em frascos de penicilina de 50 mL contendo 30 mL dos meios citados na *seção 4.4* e 6 mL de amostra (água de formação ou petróleo). Os frascos foram lacrados e incubados a 55 °C por 30 dias. Neste caso também não se isolou os microrganismos, e por isso os consórcios foram enviados ao CPQBA para

identificação das espécies presentes através da extração total do DNA, sob supervisão da Dra. Valéria M. de Oliveira.

4.5 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO

Estes ensaios foram realizados para monitorar o potencial de biodegradação dos consórcios aeróbios, anaeróbios e mistos, utilizando o petróleo P1 [Tabela 49, *pág.* 259] como fonte de carbono, através da comparação dos perfis cromatográficos obtidos por CG/EM.

4.5.1 BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA

Os consórcios aeróbios obtidos nos enriquecimentos foram centrifugados (centrífuga Harrier modelo 18/80) a 5000 g e 18 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e 2 g do precipitado celular (inóculo) foi adicionado a 39 mL de meio Zinder, acrescido de 0,5 mL de solução de bicarbonato de sódio 10 %, 0,5 mL de solução de vitaminas e 30 mg de P1 (previamente esterilizado), resultando em uma concentração final de 0,75 mg/mL.

Com o intuito de potencializar a biodegradação, utilizou-se matrizes para adsorver o petróleo na tentativa de aumentar a superfície de contato óleo-água e tornar o petróleo mais acessível ao consórcio. As matrizes utilizadas foram: areia e três diferentes folhelhos (FSA, FSB e FB). Para estes ensaios, 30 mg de P1 foi adsorvido em 1 g de areia ou 1 g de folhelho, ambos previamente esterilizados. Para isso, dissolveu-se P1 em 1 mL de diclorometano e misturou-o a matriz, em seguida evaporou-se o solvente com N₂ e esterilizou-se a amostra já adsorvida. A amostra adsorvida foi então adicionada ao meio Zinder para preparação do experimento.

4.5.2 BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA

Para os ensaios anaeróbios, acrescentou-se 1 mL do consórcio de metanogênicas e 1 mL do consórcio de bactérias sulfato-redutoras obtidos no enriquecimento, a 38 mL de meio Zinder com rezasurina acrescido de 0,4 mL de solução de bicarbonato de sódio 10 %, 0,5 mL de solução de vitaminas para metanogênicas, 0,5 mL de vitaminas para sulfato-redutoras, 0,3 mL de Na₂S, 0,3 mL de cisteína e 30 mg de P1 (previamente esterilizado).

Assim como nos ensaios aeróbios, realizou-se a adsorção do P1 também para estes ensaios. Neste caso a amostra foi adicionada antes de lacrar o frasco.

4.5.3 BIODEGRADAÇÃO MISTA

Para verificar a existência de simbiose entre os microrganismos aeróbios e anaeróbios, fez-se também um ensaio utilizando-os em associação (consórcio misto). Para isso, utilizou-se, também, 38 mL de Zinder sem rezasurina, acrescido de 0,4 mL de solução de bicarbonato de sódio 10 %, 0,5 mL de solução de vitaminas para metanogênicas, 0,5 mL de vitaminas para sulfato-redutoras, 0,3 mL de Na₂S, 0,3 mL de cisteína, 30 mg de P1 (previamente esterilizado), 2 g de consórcio aeróbio e 2 mL da suspensão obtida nos enriquecimentos anaeróbios (1 mL do consórcio de metanogênicas e 1 mL do consórcio de bactérias sulfato-redutoras).

Verificou-se também, a existência de simbiose entre as microbiotas usando o óleo adsorvido nas diferentes matrizes. Para a preparação dos ensaios seguiu-se o mesmo procedimento descrito na *seção 4.4.1*.

Controles para monitorar a pureza dos consórcios (sem adição de P1), a estabilidade do petróleo (sem adição do consórcio) e do próprio meio Zinder (sem

adição de P1 e do consórcio) foram realizados durante o período de monitoramento de todos os ensaios.

Os experimentos com consórcio aeróbio foram incubados em agitador rotacional (150 rpm/ 28 °C) e monitorados durante 60 dias.

Os experimentos com consórcio anaeróbio foram armazenados em incubadora B.O.D. a 55 °C e monitorados durante 180 dias.

Com os consórcios mistos os ensaios foram incubados por 30 dias em agitador rotacional (150 rpm/ 28 °C) e após este período foram transferidos para incubadora B.O.D. a 55 °C até completar 180 dias.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e o desvio padrão foi calculado. Os biomarcadores avaliados quanto ao processo de biodegradação tiveram seus índices de retenção (IR) calculados e comparados com a literatura. Para prever a extensão do processo de biodegradação calculou-se as taxas de biodegradação (TB) baseadas em equações que correlacionam as concentrações do padrão interno de quantificação (5 α -colestano-3-ona) e do composto analisado. Calculou-se também o índice de preferência de carbono (IPC) para fração neutra saturada.

O Índice de Retenção (IR) dos componentes detectados foi obtido utilizando-se a equação de Van Den Doll e Kratz, 1963 [**Equação 3**].

$$\text{Equação 3: } IR = \left[\frac{(T_s - TC_{n-1})}{(TC_n - TC_{n-1})} \times 100 \right] + 100 \times C_{n-1}$$

T_s = tempo de retenção da substância analisada;

TC_{n-1} = tempo de retenção do alcano que elui antes da substância analisada;

TC_n = tempo de retenção do alcano que elui após a substância analisada;

C_{n-1} = número de átomos de carbono do alcano que elui antes da substância analisada.

As taxas de biodegradação (TB, %) foram obtidas utilizando as **Equações 4, 5 e 6**.

Equação 4: $FR_{PI} = \frac{C_{PI}}{A_{PI}}$

Equação 5: $Ca = Aa \times FR_{PI}$

Equação 6: $\% TB = \left[1 - \left(\frac{Ca_t}{Ca_{t_0}} \right) \times \left(\frac{C_{PI_{t_0}}}{C_{PI_t}} \right) \right] \times 100$

FR_{PI} = fator de resposta do padrão interno (5a-colesta-3-ona, 0,02 mg/mL);

A_{PI} = área do padrão interno;

C_{PI_t} = concentração do padrão interno no tempo t;

$C_{PI_{t_0}}$ = concentração do padrão interno no tempo t_0 ;

Aa = área do composto **a** analisado;

Ca_t = concentração do composto **a** no tempo t;

Ca_{t_0} = concentração do composto **a** no tempo t_0 .

O Índice de Preferência de Carbono (IPC) para fração neutra foi calculado usando-se a **Equação 7**:

Equação 7: $IPC_{14-32} = \frac{[2 \times \Sigma (nC_{15} \text{ a } nC_{31})]}{[nC_{14} + 2 \times \Sigma (nC_{16} \text{ a } nC_{30}) + nC_{32}]}$

Cálculo do IPC para alcanos lineares

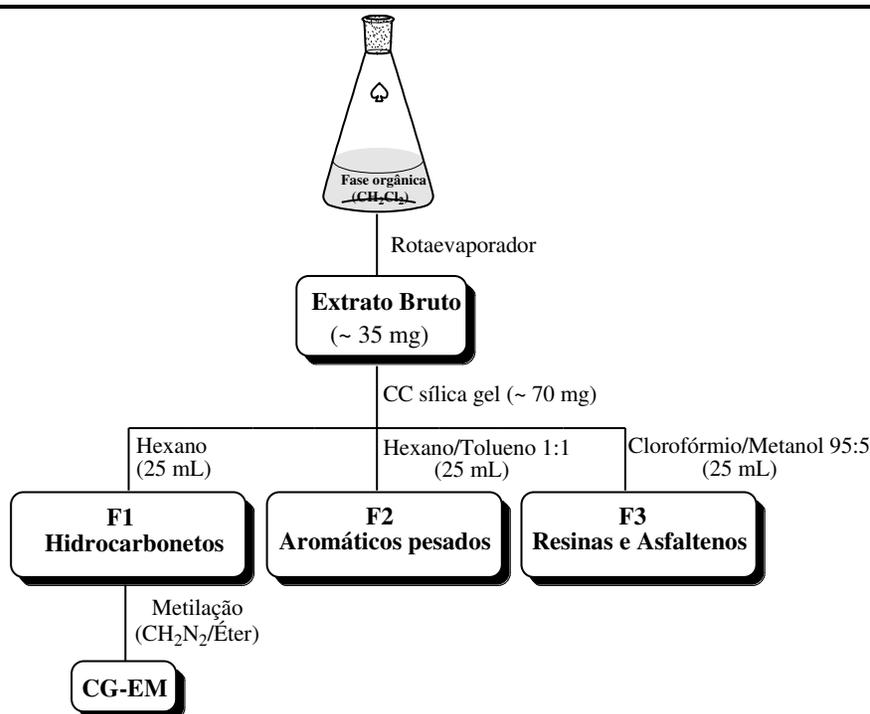
O extrato bruto foi obtido dos ensaios após extração com CH_2Cl_2 a cada 10 dias (para aeróbios) e a cada 30 dias (para anaeróbios e mistos). Os extratos obtidos foram fracionados em CC de sílica gel, como descrito na *seção 4.6*. a seguir.

4.6 TRATAMENTO ANALÍTICO DOS ÓLEOS

Para todos os ensaios foi feito fracionamento das frações neutras e para os ensaios com microrganismos aeróbios utilizando P1 adsorvido em areia, foi feito também o fracionamento para extrair os ácidos.

4.6.1 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO NEUTRA (FN)

As amostras foram submetidas a um fracionamento cromatográfico em CC de sílica gel obtendo-se 3 (três) frações neutras (FN) distintas: hidrocarbonetos saturados e insaturados (**F₁**), compostos aromáticos pesados (**F₂**) e resinas e asfaltenos (**F₃**) [Fluxograma 1].



Fluxograma 1. Método de obtenção da fração neutra. A fase orgânica foi obtida após extração dos ensaios com CH_2Cl_2 .

A **Tabela 50** apresenta as massas obtidas após purificação da fração neutra para todos os experimentos realizados.

Tabela 50. Massas obtidas da fração neutra (FN) para todos os experimentos

Co1P1d 10^a	Co1P1d 20	Co1P1d 30	Co1P1d 40	Co1P1d 50	Co1P1d 60
M = 2,50 mg	M = 5,39 mg	M = 16,82 mg	M = 11,90 mg	M = 9,42 mg	M = 16,02 mg
F1 = 0,68 mg	F1 = 2,35 mg	F1 = 7,41 mg	F1 = 3,98 mg	F1 = 4,51 mg	F1 = 6,93 mg
F2 = 0,13 mg	F2 = 0,50 mg	F2 = 3,20 mg	F2 = 3,41 mg	F2 = 2,19 mg	F2 = 1,91 mg
F3 = 0,38 mg	F3 = 0,84 mg	F3 = 4,22 mg	F3 = 3,16 mg	F3 = 2,82 mg	F3 = 3,22 mg

Co2P1d 10^a	Co2P1d 20	Co2P1d 30	Co2P1d 40	Co2P1d 50	Co2P1d 60
M = 9,41 mg	M = 15,33 mg	M = 14,02 mg	M = 14,62 mg	M = 8,82 mg	M = 15,21 mg
F1 = 5,00 mg	F1 = 7,10 mg	F1 = 6,81 mg	F1 = 7,80 mg	F1 = 4,51 mg	F1 = 6,23 mg
F2 = 1,54 mg	F2 = 2,35 mg	F2 = 3,20 mg	F2 = 1,71 mg	F2 = 2,01 mg	F2 = 2,31 mg
F3 = 1,48 mg	F3 = 4,41 mg	F3 = 3,82 mg	F3 = 4,63 mg	F3 = 2,73 mg	F3 = 3,62 mg

Co1P1a 10^b	Co1P1a 20	Co1P1a 30	Co1P1a 40	Co1P1a 50	Co1P1a 60
M = 29,10 mg	M = 29,60 mg	M = 32,41 mg	M = 34,90 mg	M = 27,23 mg	M = 27,00 mg
F1 = 15,80 mg	F1 = 15,00 mg	F1 = 15,81 mg	F1 = 15,80 mg	F1 = 14,91 mg	F1 = 16,32 mg
F2 = 4,30 mg	F2 = 5,40 mg	F2 = 3,00 mg	F2 = 8,11 mg	F2 = 5,91 mg	F2 = 4,91 mg
F3 = 5,81 mg	F3 = 9,12 mg	F3 = 11,21 mg	F3 = 10,63 mg	F3 = 6,23 mg	F3 = 5,20 mg

Co2P1a 10^b	Co2P1a 20	Co2P1a 30	Co2P1a 40	Co2P1a 50	Co2P1a 60
M = 28,10 mg	M = 32,13 mg	M = 34,21 mg	M = 31,12 mg	M = 33,21 mg	M = 25,21 mg
F1 = 12,70 mg	F1 = 15,01 mg	F1 = 15,18 mg	F1 = 13,90 mg	F1 = 21,64 mg	F1 = 12,12 mg
F2 = 4,23 mg	F2 = 6,54 mg	F2 = 7,30 mg	F2 = 7,91 mg	F2 = 6,31 mg	F2 = 5,61 mg
F3 = 4,58 mg	F3 = 8,12 mg	F3 = 10,21 mg	F3 = 8,23 mg	F3 = 3,23 mg	F3 = 5,92 mg

Co1P1fb 10^c	Co1P1fb 20	Co1P1fb 30	Co1P1fb 40	Co1P1fb 50	Co1P1fb 60
M = 15,31 mg	M = 3,00 mg	M = 14,41 mg	M = 12,90 mg	M = 19,53 mg	M = 16,00 mg
F1 = 8,66 mg	F1 = 1,65 mg	F1 = 6,41 mg	F1 = 5,68 mg	F1 = 10,31 mg	F1 = 6,63 mg
F2 = 2,23 mg	F2 = 0,40 mg	F2 = 2,20 mg	F2 = 2,11 mg	F2 = 3,59 mg	F2 = 2,41 mg
F3 = 3,28 mg	F3 = 0,54 mg	F3 = 3,82 mg	F3 = 2,06 mg	F3 = 5,52 mg	F3 = 3,92 mg

Co2P1fb 10^c	Co2P1fb 20	Co2P1fb 30	Co2P1fb 40	Co2P1fb 50	Co2P1fb 60
M = 5,50 mg	M = 21,73 mg	M = 8,51 mg	M = 13,82 mg	M = 33,01 mg	M = 20,01 mg
F1 = 3,40 mg	F1 = 5,60 mg	F1 = 4,81 mg	F1 = 7,00 mg	F1 = 11,41 mg	F1 = 7,53 mg
F2 = 0,54 mg	F2 = 0,85 mg	F2 = 1,90 mg	F2 = 1,71 mg	F2 = 4,01 mg	F2 = 2,91 mg
F3 = 1,48 mg	F3 = 2,11 mg	F3 = 2,82 mg	F3 = 2,13 mg	F3 = 6,53 mg	F3 = 4,12 mg

Co1P1fsa 10^c	Co1P1fsa 20	Co1P1fsa 30	Co1P1fsa 40	Co1P1fsa 50	Co1P1fsa 60
M = 10,91 mg	M = 13,00 mg	M = 10,51 mg	M = 18,70 mg	M = 11,73 mg	M = 13,00 mg
F1 = 2,90 mg	F1 = 5,90 mg	F1 = 4,81 mg	F1 = 7,80 mg	F1 = 4,61 mg	F1 = 5,82 mg
F2 = 0,40 mg	F2 = 2,60 mg	F2 = 2,10 mg	F2 = 3,21 mg	F2 = 2,81 mg	F2 = 2,31 mg
F3 = 1,21 mg	F3 = 2,62 mg	F3 = 2,71 mg	F3 = 3,93 mg	F3 = 3,33 mg	F3 = 3,60 mg

Co2P1fsa 10^c	Co2P1fsa 20	Co2P1fsa 30	Co2P1fsa 40	Co2P1fsa 50	Co2P1fsa 60
M = 19,60 mg	M = 16,53 mg	M = 16,91 mg	M = 16,22 mg	M = 24,41 mg	M = 16,61 mg
F1 = 8,60 mg	F1 = 7,81 mg	F1 = 9,08 mg	F1 = 8,30 mg	F1 = 13,14 mg	F1 = 7,32 mg
F2 = 2,23 mg	F2 = 2,31 mg	F2 = 3,20 mg	F2 = 2,71 mg	F2 = 2,41 mg	F2 = 2,91 mg
F3 = 3,08 mg	F3 = 2,72 mg	F3 = 4,01 mg	F3 = 3,43 mg	F3 = 3,53 mg	F3 = 4,32 mg

Co1P1fsb 10^c	Co1P1fsb 20	Co1P1fsb 30	Co1P1fsb 40	Co1P1fsb 50	Co1P1fsb 60
M = 7,61 mg	M = 12,00 mg	M = 11,11 mg	M = 11,70 mg	M = 19,03 mg	M = 23,10 mg
F1 = 3,30 mg	F1 = 4,70 mg	F1 = 5,71 mg	F1 = 4,90 mg	F1 = 6,31 mg	F1 = 5,62 mg
F2 = 1,10 mg	F2 = 1,00 mg	F2 = 1,30 mg	F2 = 3,01 mg	F2 = 4,01 mg	F2 = 3,11 mg
F3 = 1,01 mg	F3 = 1,72 mg	F3 = 2,51 mg	F3 = 3,43 mg	F3 = 8,13 mg	F3 = 4,40 mg

Co2P1fsb 10^c	Co2P1fsb 20	Co2P1fsb 30	Co2P1fsb 40	Co2P1fsb 50	Co2P1fsb 60
M = 25,00 mg	M = 10,23 mg	M = 10,61 mg	M = 9,52 mg	M = 23,01 mg	M = 22,41 mg
F1 = 10,80 mg	F1 = 3,81 mg	F1 = 5,28 mg	F1 = 4,80 mg	F1 = 7,74 mg	F1 = 6,42 mg
F2 = 8,03 mg	F2 = 0,81 mg	F2 = 1,30 mg	F2 = 1,21 mg	F2 = 2,71 mg	F2 = 2,71 mg
F3 = 6,08 mg	F3 = 1,82 mg	F3 = 1,71 mg	F3 = 1,83 mg	F3 = 5,53 mg	F3 = 3,62 mg

ANP1d 30^d	ANP1d 60	ANP1d 90	ANP1d 120	ANP1d 150	ANP1d 180
M = 13,20 mg	M = 16,53 mg	M = 28,21 mg	M = 14,61 mg	M = 23,81 mg	M = 14,61 mg
F1 = 6,28 mg	F1 = 8,75 mg	F1 = 15,11 mg	F1 = 6,41 mg	F1 = 8,41 mg	F1 = 7,13 mg
F2 = 1,33 mg	F2 = 1,70 mg	F2 = 2,80 mg	F2 = 1,60 mg	F2 = 1,59 mg	F2 = 2,91 mg
F3 = 4,48 mg	F3 = 3,64 mg	F3 = 8,02 mg	F3 = 5,32 mg	F3 = 10,22 mg	F3 = 3,42 mg

ANP1a 30^e	ANP1a 60	ANP1a 90	ANP1a 120	ANP1a 150	ANP1a 180
M = 11,70 mg	M = 116,75 mg	M = 31,92 mg	M = 32,46 mg	M = 17,28 mg	M = 27,46 mg
F1 = 6,78 mg	F1 = 11,67 mg	F1 = 13,61 mg	F1 = 14,64 mg	F1 = 5,74 mg	F1 = 13,53 mg
F2 = 2,33 mg	F2 = 2,87 mg	F2 = 4,78 mg	F2 = 4,50 mg	F2 = 1,95 mg	F2 = 5,49 mg
F3 = 2,18 mg	F3 = 2,06 mg	F3 = 7,10 mg	F3 = 6,63 mg	F3 = 3,22 mg	F3 = 7,54 mg

ANP1fb 30^f	ANP1fb 60	ANP1fb 90	ANP1fb 120	ANP1fb 150	ANP1fb 180
M = 17,10 mg	M = 29,05 mg	M = 12,32 mg	M = 16,06 mg	M = 17,48 mg	M = 26,36 mg
F1 = 8,18 mg	F1 = 4,65 mg	F1 = 5,11 mg	F1 = 4,11 mg	F1 = 6,21 mg	F1 = 10,23 mg
F2 = 1,73 mg	F2 = 1,30 mg	F2 = 2,30 mg	F2 = 3,50 mg	F2 = 3,89 mg	F2 = 1,91 mg
F3 = 2,58 mg	F3 = 3,24 mg	F3 = 4,12 mg	F3 = 5,12 mg	F3 = 5,32 mg	F3 = 12,12 mg

ANP1fsa 30^f	ANP1fsa 60	ANP1fsa 90	ANP1fsa 120	ANP1fsa 150	ANP1fsa 180
M = 2,40 mg	M = 12,65 mg	M = 6,22 mg	M = 7,06 mg	M = 5,38 mg	M = 23,46 mg
F1 = 0,27 mg	F1 = 0,77 mg	F1 = 1,31 mg	F1 = 1,24 mg	F1 = 0,74 mg	F1 = 6,23 mg
F2 = 0,83 mg	F2 = 0,27 mg	F2 = 1,38 mg	F2 = 2,30 mg	F2 = 2,65 mg	F2 = 1,29 mg
F3 = 0,18 mg	F3 = 0,16 mg	F3 = 1,50 mg	F3 = 3,03 mg	F3 = 2,72 mg	F3 = 10,04 mg

ANP1fsb 30^f	ANP1fsb 60	ANP1fsb 90	ANP1fsb 120	ANP1fsb 150	ANP1fsb 180
M = 2,50 mg	M = 13,05 mg	M = 7,22 mg	M = 7,56 mg	M = 12,82 mg	M = 16,84 mg
F1 = 0,28 mg	F1 = 0,77 mg	F1 = 1,51 mg	F1 = 0,86 mg	F1 = 1,87 mg	F1 = 5,45 mg
F2 = 0,33 mg	F2 = 0,17 mg	F2 = 1,38 mg	F2 = 2,15 mg	F2 = 2,49 mg	F2 = 1,14 mg
F3 = 0,38 mg	F3 = 0,16 mg	F3 = 1,61 mg	F3 = 3,26 mg	F3 = 3,42 mg	F3 = 7,85 mg

Co1ANd 30^g	Co1ANd 60	Co1ANd 90	Co1ANd 120	Co1ANd 150	Co1ANd 180
M = 32,05 mg	M = 28,35 mg	M = 29,42 mg	M = 29,06 mg	M = 28,82 mg	M = 31,14 mg
F1 = 15,08 mg	F1 = 15,61 mg	F1 = 16,08 mg	F1 = 19,90 mg	F1 = 17,64 mg	F1 = 11,92 mg
F2 = 5,10 mg	F2 = 6,81 mg	F2 = 5,80 mg	F2 = 4,51 mg	F2 = 4,41 mg	F2 = 2,41 mg
F3 = 6,28 mg	F3 = 5,12 mg	F3 = 6,81 mg	F3 = 2,13 mg	F3 = 5,93 mg	F3 = 10,02 mg

Co2ANd 30^g	Co2ANd 60	Co2ANd 90	Co2ANd 120	Co2ANd 150	Co2ANd 180
M = 26,06 mg	M = 28,32 mg	M = 27,14 mg	M = 31,35 mg	M = 26,32 mg	M = 30,44 mg
F1 = 12,30 mg	F1 = 12,44 mg	F1 = 16,52 mg	F1 = 16,41 mg	F1 = 16,21 mg	F1 = 20,73 mg
F2 = 4,81 mg	F2 = 8,71 mg	F2 = 4,91 mg	F2 = 8,10 mg	F2 = 4,79 mg	F2 = 4,41 mg
F3 = 5,23 mg	F3 = 6,43 mg	F3 = 5,22 mg	F3 = 6,42 mg	F3 = 4,42 mg	F3 = 3,12 mg

Co1ANa 30^h	Co1ANa 60	Co1ANa 90	Co1ANa 120	Co1ANa 150	Co1ANa 180
M = 37,30 mg	M = 30,15 mg	M = 30,02 mg	M = 32,7 mg	M = 125,82 mg	M = 30,14 mg
F1 = 21,50 mg	F1 = 12,31 mg	F1 = 21,08 mg	F1 = 19,40 mg	F1 = 7,04 mg	F1 = 14,52 mg
F2 = 7,03 mg	F2 = 6,51 mg	F2 = 3,20 mg	F2 = 6,21 mg	F2 = 2,41 mg	F2 = 4,71 mg
F3 = 7,88 mg	F3 = 8,22 mg	F3 = 5,41 mg	F3 = 4,33 mg	F3 = 2,13 mg	F3 = 7,22 mg

Co2ANa 30^h	Co2ANa 60	Co2ANa 90	Co2ANa 120	Co2ANa 150	Co2ANa 180
M = 38,70 mg	M = 28,05 mg	M = 27,62 mg	M = 30,06 mg	M = 21,72 mg	M = 28,34 mg
F1 = 22,78 mg	F1 = 13,85 mg	F1 = 16,81 mg	F1 = 19,7 mg	F1 = 9,71 mg	F1 = 15,13 mg
F2 = 5,73 mg	F2 = 5,70 mg	F2 = 4,40 mg	F2 = 6,10 mg	F2 = 4,29 mg	F2 = 4,41 mg
F3 = 9,88 mg	F3 = 7,44 mg	F3 = 5,62 mg	F3 = 4,32 mg	F3 = 5,72 mg	F3 = 7,02 mg

Co1ANfb 30ⁱ	Co1ANfb 60	Co1ANfb 90	Co1ANfb 120	Co1ANfb 150	Co1ANfb 180
M = 10,75 mg	M = 13,95 mg	M = 15,22 mg	M = 31,76 mg	M = 26,92 mg	M = 9,94 mg
F1 = 5,58 mg	F1 = 7,01 mg	F1 = 5,78 mg	F1 = 8,50 mg	F1 = 9,14 mg	F1 = 5,72 mg
F2 = 2,10 mg	F2 = 2,21 mg	F2 = 3,30 mg	F2 = 3,11 mg	F2 = 2,41 mg	F2 = 0,51 mg
F3 = 2,78 mg	F3 = 2,22 mg	F3 = 4,81 mg	F3 = 14,43 mg	F3 = 13,23 mg	F3 = 1,42 mg

Co2ANfb 30ⁱ	Co2ANfb 60	Co2ANfb 90	Co2ANfb 120	Co2ANfb 150	Co2ANfb 180
M = 17,26 mg	M = 13,22 mg	M = 26,44 mg	M = 28,85 mg	M = 29,72 mg	M = 27,44 mg
F1 = 10,80 mg	F1 = 8,84 mg	F1 = 11,92 mg	F1 = 8,31 mg	F1 = 9,51 mg	F1 = 11,73 mg
F2 = 3,51 mg	F2 = 1,81 mg	F2 = 5,11 mg	F2 = 2,00 mg	F2 = 2,59 mg	F2 = 2,21 mg
F3 = 2,83 mg	F3 = 1,93 mg	F3 = 7,92 mg	F3 = 13,92 mg	F3 = 16,92 mg	F3 = 11,72 mg

Co1ANfsa 30ⁱ	Co1ANfsa 60	Co1ANfsa 90	Co1ANfsa 120	Co1ANfsa 150	Co1ANfsa
M = 8,00 mg	M = 7,55 mg	M = 9,52 mg	M = 11,67 mg	M = 25,22 mg	180
					M = 16,74 mg
F1 = 3,70 mg	F1 = 2,51 mg	F1 = 4,38 mg	F1 = 3,10 mg	F1 = 4,34 mg	F1 = 8,92 mg
F2 = 1,73 mg	F2 = 1,61 mg	F2 = 2,20 mg	F2 = 3,01 mg	F2 = 1,61 mg	F2 = 1,61 mg
F3 = 1,98 mg	F3 = 2,12 mg	F3 = 2,31 mg	F3 = 3,83 mg	F3 = 12,73 mg	F3 = 2,22 mg

Co2ANfsa 30ⁱ	Co2ANfsa 60	Co2ANfsa 90	Co2ANfsa 120	Co2ANfsa 150	Co2ANfsa
M = 7,20 mg	M = 8,25 mg	M = 13,42 mg	M = 16,26 mg	M = 27,22 mg	180
					M = 19,64 mg
F1 = 2,98 mg	F1 = 2,55 mg	F1 = 4,41 mg	F1 = 7,17 mg	F1 = 6,81 mg	F1 = 6,13 mg
F2 = 1,63 mg	F2 = 1,70 mg	F2 = 3,40 mg	F2 = 3,20 mg	F2 = 2,39 mg	F2 = 0,41 mg
F3 = 2,08 mg	F3 = 2,04 mg	F3 = 4,62 mg	F3 = 5,22 mg	F3 = 16,21 mg	F3 = 6,42 mg

Co1ANfsb 30ⁱ	Co1ANfsb 60	Co1ANfsb 90	Co1ANfsb 120	Co1ANfsb 150	Co1ANfsb
M = 7,50 mg	M = 5,35 mg	M = 7,42 mg	M = 18,87 mg	M = 15,22 mg	180
					M = 18,94 mg
F1 = 2,30 mg	F1 = 3,41 mg	F1 = 4,28 mg	F1 = 9,20 mg	F1 = 6,14 mg	F1 = 5,72 mg

F2 = 1,33 mg	F2 = 0,51 mg	F2 = 3,70 mg	F2 = 3,61 mg	F2 = 2,11 mg	F2 = 2,01 mg
F3 = 1,98 mg	F3 = 0,72 mg	F3 = 4,41 mg	F3 = 4,43 mg	F3 = 5,83 mg	F3 = 8,92 mg

Co2ANfsb 30 ⁱ	Co2ANfsb 60	Co2ANfsb 90	Co2ANfsb 120	Co2ANfsb 150	Co2ANfsb
M = 8,30 mg	M = 7,55 mg	M = 16,72 mg	M = 15,26 mg	M = 24,92 mg	180
					M = 13,54 mg
F1 = 3,88 mg	F1 = 3,75 mg	F1 = 4,51 mg	F1 = 5,77 mg	F1 = 4,51 mg	F1 = 5,83 mg
F2 = 1,93 mg	F2 = 0,10 mg	F2 = 3,50 mg	F2 = 3,30 mg	F2 = 1,49 mg	F2 = 0,81 mg
F3 = 2,48 mg	F3 = 2,54 mg	F3 = 4,72 mg	F3 = 4,22 mg	F3 = 14,21 mg	F3 = 6,102 mg

^aConsórcios aeróbios Co1 e Co2 com P1 adicionado direto ao meio de 10 a 60 dias;

^bConsórcios aeróbios Co1 e Co2 com P1 adsorvido em areia de 10 a 60 dias;

^cConsórcios aeróbios Co1 e Co2 com P1 adsorvido em folhelhos FB, FSA e FSB de 10 a 60 dias;

^dConsórcio anaeróbio AN com P1 adicionado direto ao meio de 30 a 180 dias;

^eConsórcio anaeróbio AN com P1 adsorvido em areia de 30 a 180 dias;

^fConsórcio anaeróbio AN com P1 adsorvido em folhelhos FB, FSA e FSB de 30 a 180 dias;

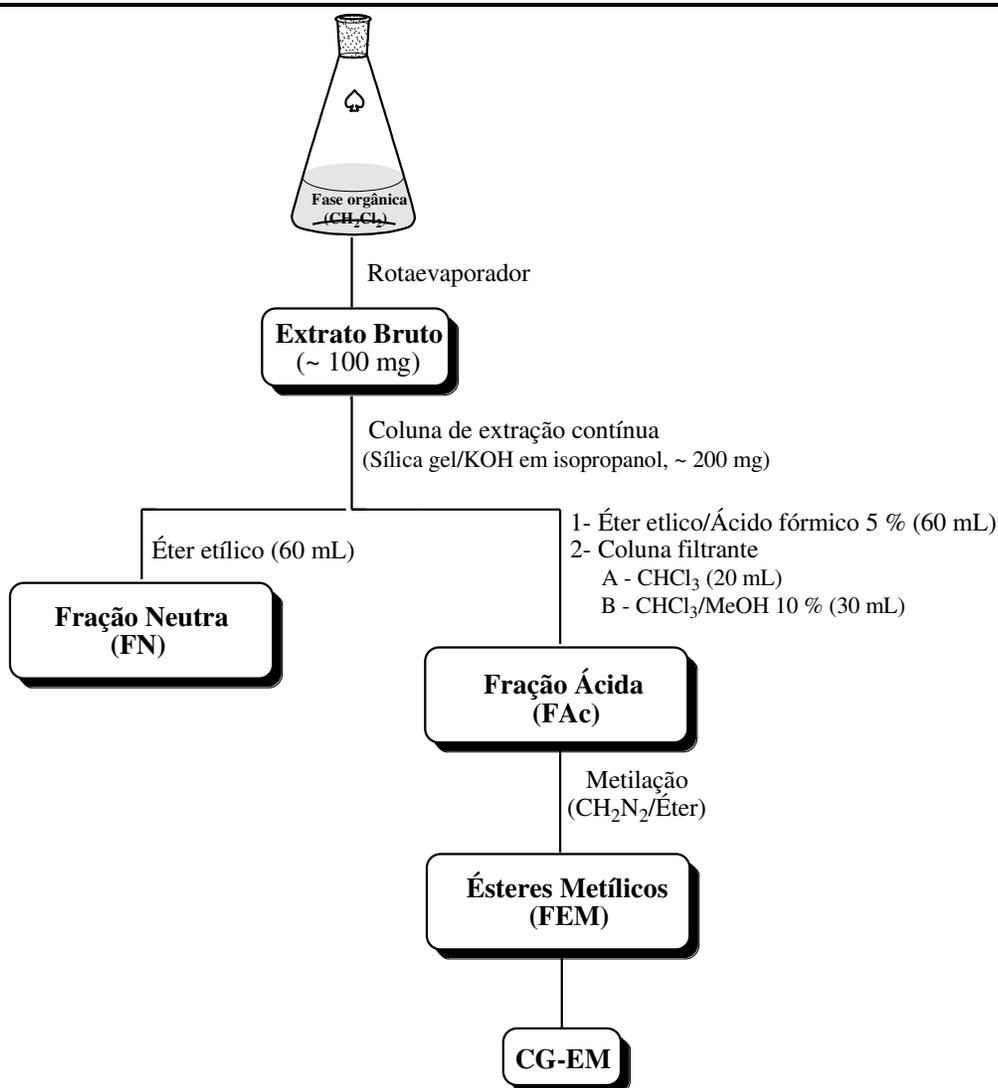
^gConsórcios mistos Co1AN e Co2AN com P1 adicionado direto ao meio de 30 a 180 dias;

^hConsórcios mistos Co1AN e Co2AN com P1 adsorvido em areia de 30 a 180 dias;

ⁱConsórcios mistos Co1AN e Co2AN com P1 adsorvido em folhelhos FB, FSA e FSB de 30 a 180 dias.

4.6.2 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ÁCIDA

Para obter a fração ácida, as amostras foram submetidas a uma coluna de extração contínua contendo sílica gel impregnada com KOH (25 mg) em isopropanol (0,4 mL). Cerca de 100,0 mg da amostra (extrato bruto obtido a partir dos ensaios) foi transferida para a coluna e submetida à extração contínua com éter etílico para remoção dos compostos neutros. Após remoção dos componentes neutros, utilizou-se 2% de ácido fórmico em éter etílico para extração dos componentes ácidos (Koike et al., 1992). A fração ácida (**FAc**) foi, posteriormente, transformada em ésteres metílicos (**FEM**) utilizando-se solução etérea de diazometano [**Fluxograma 2**]



Fluxograma 2. Método de obtenção das frações ácida e de ésteres metílicos derivados de ácidos. A fase orgânica foi obtida após extração dos ensaios com CH_2Cl_2 .

Somente o ensaio com consórcio aeróbio Co1 e P1 adsorvido em areia foi submetido ao estudo dos ácidos. As massas obtidas em cada etapa do processo de fracionamento desta fração estão descritas na **Tabela 51**.

Tabela 51. Massas e rendimentos obtidos da fração ácida (FAc).

Tempo (dias)	Extrato bruto (mg)	FAc (mg)	FEM (mg)
10	68,70	14,82	2,20
20	100,90	21,23	2,61
30	93,20	19,42	2,30
40	101,8	22,12	2,76
50	101,2	22,03	2,56
60	89,40	18,85	1,97

4.7 MÉTODOS DE ANÁLISE

4.7.1 CROMATOGRAFIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Após fracionamento e/ou extração das frações neutra e ácida e suas derivatizações, as amostras foram analisadas utilizando um CG (HP5890II) acoplado a um detector seletivo de massas (HP 5970-MSD) através das técnicas de varredura de íons totais (**TIC**, *Total Ion Chromatogram*) e monitoramento de íons selecionados (**SIM**, *Single Ion Monitoring*).

Os programas utilizados para detecção e monitoramento do processo de biodegradação dos biomarcadores presentes nas frações neutras e ácidas estão descritos a seguir:

- ❖ **Programa I** – Análise de alcanos, isoprenóides e sesquiterpanos bicíclicos: Injetor a 300 °C; Linha de transferência a 260 °C; Forno a 80 °C(2 min.)/270 °C (4 °C/min)/300 °C (10 °C/min.)(25min.). Coluna Capilar MDN5S 30m x 0,25mm; 0,25µm;

❖ **Programa II:** Análise de terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos; esteranos normais, alquil esteranos e diasteranos: Injetor a 300 °C; Linha de transferência a 260 °C; Forno a 70 °C(2 min.)/190 °C (30 °C/min)/250 °C (1 °C/min.)/300 °C (2 °C/min.) (25min.). Coluna Capilar MDN5S 30m x 0,25mm; 0,25µm;

➤ **Íons utilizados (*m/z*):** 43, 149, 151, 163, 177, 191, 217, 218, 231, 232, 247, 259, 260, 262, 276, 288, 290, 302, 304, 318, 330, 332, 344, 358, 360, 370, 372, 384, 386, 398, 400, 412, 414, 426, 440, 442, 454, 456, 468, 470 e 482.

❖ **Programa III:** Análise de esteranos normais, alquil esteranos e diasteranos: Injetor a 300 °C; Linha de transferência a 260 °C; Forno a 70 °C(2 min.)/190 °C (30 °C/min)/250 °C (1 °C/min.)/300 °C (2 °C/min.) (25min.). Coluna Capilar MDN5S 30m x 0,25mm; 0,25µm;

➤ **Íons utilizados (*m/z*):** 217, 231, 245, 259, 273, 287, 288, 301, 302, 315, 316, 329, 330, 343, 344, 357, 358, 371, 372, 385, 386, 399, 400, 413, 414, 427, 428, 441, 442, 455, 456, 469, 470 e 484.

➤ **Programa IV:** Análise de ésteres metílicos derivados da fração ácida: Injetor a 280 °C; Linha de Transferência a 250 °C; Forno a 100 °C (0,89 min.)/300 °C (2,5 °C/min) (30min.). Coluna Capilar MDN5S 30m x 0,25mm; 0,25µm;

➤ **Técnicas de Análises por EM:** para todos os programas foi feito varredura total de íons (**TIC**) e monitoramento seletivo de íons (**SIM**).

4.8 PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DE SUBSTÂNCIAS EXOPOLIMÉRICAS (EPS)

4.8.1 REATIVAÇÃO DOS CONSÓRCIOS

Os consórcios aeróbios (Co1 e Co2) obtidos a partir dos enriquecimentos foram centrifugados e 0,5 g do *pellet* obtido foi reativado em tubos de ensaio (21 tubos) contendo 10 mL de meio Zinder adicionado de 0,1 mL de soluções de bicarbonato de sódio 10 % e de vitaminas e 1 mL de solução de glicose 8 mg/mL como fonte de carbono. Os tubos de ensaio foram armazenados em incubadora B.O.D. a 30 °C durante 48 horas.

4.8.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.8.2.1 Determinação e quantificação da biomassa e EPS produzidos

A produção dos EPS foi avaliada utilizando-se como fonte de carbono: [9] glicose (controle); [10] 9,10-diidrofenantreno; [11] nonadecano; [12] ácido nonadecanóico, [13] mistura entre [10], [11] e [12], Petróleo não biodegradado, P1, [14] Petróleo biodegradado, P2 [15].

Os consórcios reativados foram transferidos para erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de meio Zinder sem resazurina, 3 mL de soluções de bicarbonato e vitaminas e 1 mL de cada uma das soluções utilizadas como fonte de carbono, separadamente, obtendo-se uma concentração final aproximada de 0,03 mg/mL. Para o experimento com a mistura de substratos, adicionou-se 1 mL de cada solução que compõe a mistura (9,10-diidrofenantreno; nonadecano; ácido nonadecanóico). Os ensaios foram realizados em triplicata (total de 21 erlenmeyers) e incubados por 5 dias

(para substratos 1, 2, 3, 4 e 7) e por 10 dias (para substratos 5 e 6) em incubadora B.O.D. a 30 °C.

Após este período realizou-se centrifugação (5000 g, 20 minutos, 10 °C). O precipitado obtido (biomassa úmida) foi transferido para tubos Falcon e armazenado em freezer (- 20 °C) para ser utilizado na quantificação dos EPS. O sobrenadante (que continha o EPS) foi utilizado para quantificação, caracterização e determinação das propriedades tensoativas (tensão superficial e índice de emulsificação).

Uma parte do sobrenadante (250 mL) foi transferido para balão de fundo redondo e concentrado em evaporador rotativo até o volume de 30 mL. Precipitou-se o concentrado com 90 mL de etanol gelado, acrescentou-se 10 mL de água Milli-Q e fez-se a centrifugação. O *pellet* obtido foi dissolvido com 20 mL de água Milli-Q e dialisado utilizando-se saco de diálise 25 x 16 mm (*Inlab*) com porosidade de 25 °A durante 24 horas. Separou-se 10 mL do volume do EPS dialisado para às análises de caracterização (teor de carboidratos, proteínas e ácidos urânicos).

O volume restante (10 mL) do EPS dialisado, assim como a biomassa gerada (previamente armazenada em tubos Falcon), foram liofilizados, separadamente, durante 48 horas. Após a liofilização, calculou-se o rendimento total de EPS produzidos através da relação entre a massa de EPS e a biomassa dos consórcios.

4.8.3 ACOMPANHAMENTO DO CRESCIMENTO BACTERIANO E BIODEGRADAÇÃO DOS SUBSTRATOS

No início ($t = 0$) e a cada 48 horas de monitoramento do experimento para produção de EPS, foram retiradas alíquotas de 1 mL dos enrlenmeyers para acompanhar o aumento da densidade celular e a biodegradação dos substratos utilizados como fonte de carbono. O aumento da densidade celular foi monitorado visualmente (aumento da

turbidez no meio) e através de medidas de absorvância no comprimento de onda de 450 nm, como descrito por Johnsen *et al* (2002).

A biodegradação foi monitorada até 5 dias para os substratos [10] 9,10-diidrofenantreno; [11] nonadecano; [12] ácido nonadecanóico e [13] mistura entre [10], [11], [12] e até 10 dias para o substrato [14] Petróleo não biodegradado, P1. Para isso, as alíquotas de 1 mL foram extraídas com diclorometano (3 x 1 mL). Para os substratos [10], [11], [12] e [13], os extratos foram reunidos, secos sob fluxo de N₂, metilados, ressuspensos em 1 mL de acetato de etila e acrescidos de 10 µL do padrão interno (pentadecano, 0,05 mg/mL) para seguir a análise por CG-EM. As análises por CG-EM foram feitas utilizando modo splitless, com injetor à temperatura de 240 °C e rampa de temperatura de 50 °C (5/min)/225 °C (10 °/min.)/290 °C (30 °C/min.) (5min.). A Coluna Capilar utilizada foi do tipo MDN5S 30m x 0,25mm; 0,25µm. Para o substrato [14], os extratos foram reunidos, secos sob fluxo de N₂ e fracionados em coluna cromatográfica de sílica “flash” de acordo com o **Fluxograma 1** [seção 4.6.1, pág.269]. As frações F1 foram metiladas com diazometano, ressuspensas em 1 mL de acetato de etila e acrescidos de 5 µL do padrão interno (5α-colestan-3-ona, 0,02 mg/mL) para seguir a análise por CG-EM. As análises por CG-EM foram feitas utilizando injetor no modo split, à temperatura de 300 °C seguindo o **Programa I** [seção 4.7.1, pág. 282].

Para todas as análises foi feito varredura total de íons (TIC) com valores de *m/z* 50 a 700.

4.8.4 DOSAGEM DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E ÁCIDOS URÔNICOS

A quantificação indireta de biossurfactantes produzidos foi realizada através de medidas espectrofotométricas de absorvância na região do UV-Vis para determinação dos teores de carboidratos, proteínas e ácidos urânicos.

4.8.4.1 Dosagem de Carboidratos

Para determinação do teor de carboidratos utilizou-se o método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Para desenvolver esta metodologia, adicionou-se em tubos de ensaio (lavados com acetona e secos a 100 °C) 0,4 mL do EPS dialisado, 0,4 mL de água Milli-Q e 0,4 mL de solução aquosa de fenol 5 %. A mistura foi homogeneizada com auxílio de um vortex e adicionou-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Agitou-se novamente a mistura e deixou-a em repouso por 15 minutos. Após este período, fez-se a leitura da absorbância a 490 nm. Como branco reacional utilizou-se 0,8 mL de água Milli-Q em substituição ao EPS. Para determinar a quantidade de carboidratos, fez-se necessário a construção de uma curva de calibração. A curva foi construída a partir de uma solução estoque de glicose (8,00 mg/mL) que foi diluída para concentrações de 3,12, 6,25, 12,50 e 25,00 mg/mL. Então, a 0,8 mL de cada uma destas soluções de glicose foi adicionado 0,4 mL da solução de fenol e 2 mL do ácido sulfúrico. A **Figura 110** mostra a curva de calibração para a glicose (concentração x absorbância).

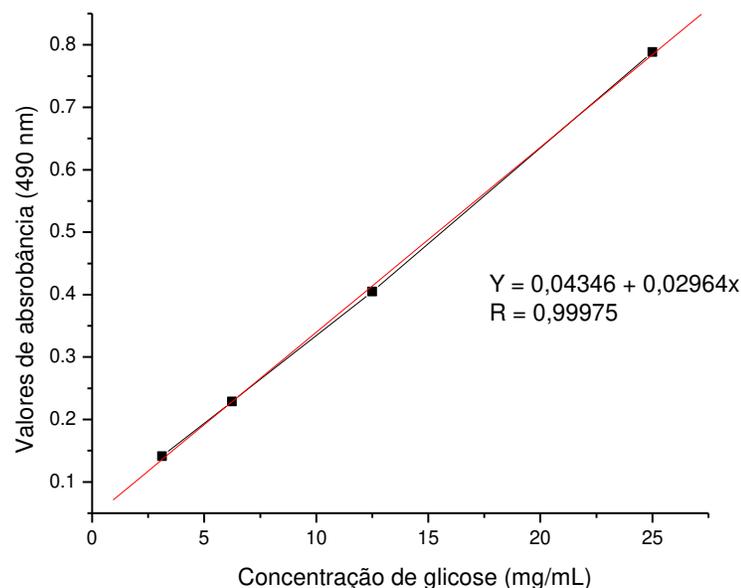


Figura 110. Curva de calibração da glicose utilizada na quantificação de carboidratos presentes nas mostras de biossurfactantes produzidos pelos consórcios aeróbios.

4.8.4.2 Dosagem de Proteínas

Para determinação do teor de proteínas nos EPS produzidos, utilizou-se a metodologia descrita por Bradford (1976) e leitura da absorbância à 595 nm.

Para desenvolver a metodologia, inicialmente preparou-se uma solução 2 mg/mL do corante “Brilliant Blue Coomassie” através da diluição de 100 mg em 50 mL de etanol absoluto estéril e também uma solução aquosa de ácido fosfórico 85 %. Após o preparo das soluções, adicionou-se, em tubos de ensaio, 250 µL de EPS dialisado e 2,5 mL das soluções do corante e de ácido fosfórico. O teor de proteínas foi determinado a partir de uma curva de calibração utilizando Albumina de Soro Bovino (BSA) diluída em solução aquosa de NaCl 0,15 mol/L à concentrações de 0,25, 0,50, 1,00 e 2,00 mg/mL. Para construir a curva, 250 µL da solução salina de BSA foi adicionado a 2,5 mL das soluções de corante e ácido fosfórico. Para o branco adicionou-se 250 µL da solução de NaCl em substituição ao EPS. A **Figura 111** mostra a curva de calibração para a proteína BSA (concentração x absorbância).

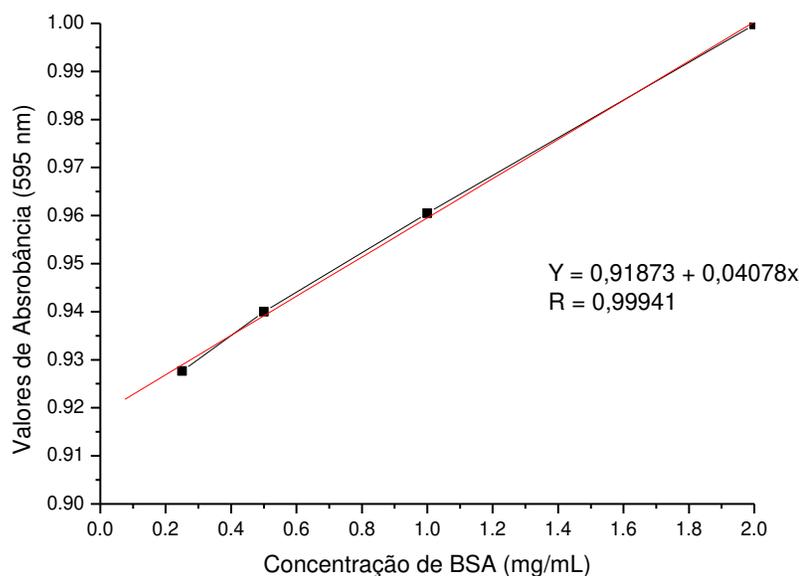


Figura 111. Curva de calibração da BSA utilizada na quantificação de proteínas presentes nas mostras de biossurfactantes produzidos pelos consórcios aeróbios.

4.8.4.3 Dosagem de Ácidos Urônicos

Os teores de ácidos urônicos foram determinados utilizando-se a metodologia descrita por Blumenkratz e ASboe-Hansen (1973).

Inicialmente preparou-se soluções de meta-hidroxi-difenila 0,15 % em NaOH 0,5 % e solução de tetraborato de sódio 0,0125 mol/L em ácido sulfúrico concentrado, para utilizar na quantificação dos ácidos urônicos. Em tubos de ensaio, adicionou-se 0,4 mL de EPS dialisado e 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio. Os tubos foram colocados em estufa a 100 °C por 45 minutos. Após este período eles foram colocados em banho de gelo por 5 minutos, seguido da adição de 40 µL da solução de meta-hidroxi-difenila e agitação em vortex. Após este período, fez-se a leitura da absorbância a 520 nm. Como branco reacional utilizou-se 0,4 mL de água Milli-Q em substituição ao EPS.

Para construção da curva de calibração utilizou-se ácido galacturônico nas concentrações de 0,25, 0,50, 1,00 e 2,00 mg/mL, onde, 0,4 mL de cada uma das soluções do ácido galacturônico foi utilizado em substituição ao EPS. A **Figura 112** mostra a curva de calibração para o ácido galacturônico (concentração x absorbância).

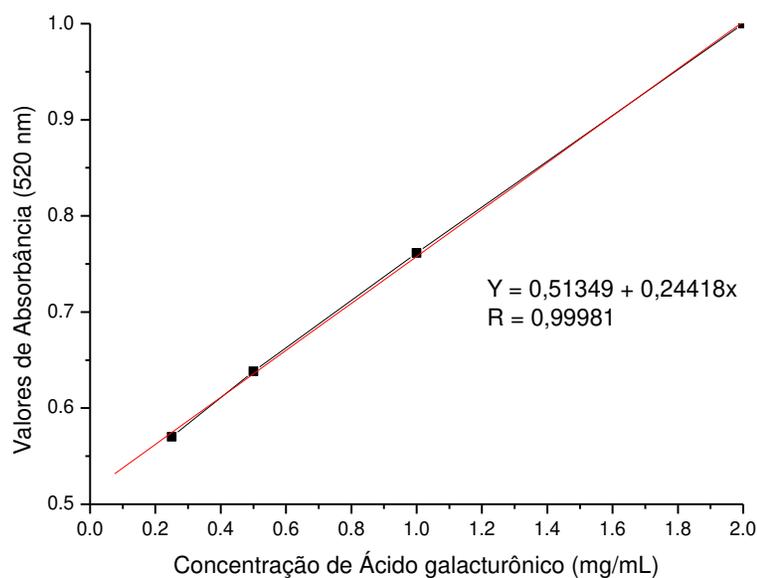


Figura 112. Curva de calibração do ácido galacturônico utilizado na quantificação de ácidos urônicos presentes nas mostras de biossurfactantes produzidos pelos consórcios aeróbios.

4.8.5 PROPRIEDADES DOS BIOSSURFACTANTES

4.8.5.1 Medida da Tensão Superficial (TS)

Este experimento foi realizado sob supervisão e colaboração do Prof. Dr. Watson Loh do IQ-UNICAMP.

A medida da tensão superficial foi realizada com 20 mL do sobrenadante (que continha o EPS) utilizando-se o tensiômetro KSV modelo sigma 701 acoplado a um banho Thermomix® UB a 25 °C. O equipamento foi calibrado sempre no início e término das análises medindo-se a tensão superficial da água ultra pura e do meio Zinder. As análises foram feitas pelo método do anel, utilizando um anel de platina denominado de anel de Du Nouy. Neste método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. Uma força adicional é exercida sobre o anel e no momento em que a lâmina de líquido se rompe, é determinada a tensão superficial (Krüss, 1994).

4.8.5.2 Medida do Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação (E %) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Em tubos de ensaio adicionou-se 4 mL de diferentes hidrocarbonetos (tolueno, octadecano e diesel) e 2 mL dos sobrenadantes (EPS). A mistura foi agitada em vortex por 2 minutos. Os valores de E foram expressos após 24h como percentagem através da medida da altura da emulsão, He pela altura total do líquido, Ht [Figura 113]. Tween 80 (Sigma-Aldrich) foi usado como controle de um surfactante químico.

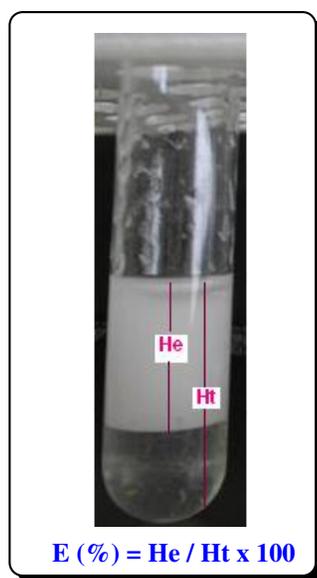


Figura 113. Representação esquemática do procedimento adotado para medir o índice de emulsificação dos biossurfactantes produzidos pelos consórcios aeróbios.

4.8.6 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EPS

Para a realização desta etapa, foi necessário repetir o ensaio de produção de EPS com intuito de utilizar todo o EPS produzido para caracterização química.

4.8.6.1 Extração

Todo o sobrenadante (que continha o EPS) foi concentrado em evaporador rotativo até o volume de 30 mL. Seguiu-se a precipitação com etanol gelado, adição de água Milli-Q estéril e centrifugação. O *pellet* obtido foi dissolvido com 20 mL de HCl 0,4 mol/l e submetido à extração com 3 x 20 mL de clorofórmio:metanol (2:1, v/v). A fase orgânica foi evaporada à temperatura de 40 °C em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato bruto que foi caracterizado por espectrometria de massas (infusão direta) utilizando a ionização por electrospray – MS-ESI.

4.8.6.2 Caracterização química dos EPS

As amostras foram caracterizadas por infravermelho e por espectrometria de massas. Para análise no infravermelho as amostras foram pulverizadas e prensadas para formação da pastilha.

Para a análise por espectrometria de massas, as amostras foram analisadas por injeção direta com um fluxo de 10 µL/min. O fluxo do gás nitrogênio foi mantido a 5 µL/min. A temperatura de aquecimento do capilar foi de 275 °C com uma voltagem de 34 V e a voltagem do spray foi de 3 kV. As amostras foram dissolvidas em água:metanol (1:1, v/v) acrescidas de 0,1 % de ácido fórmico à concentração final de 1 pg/mL e analisadas no modo íon positivo com varredura na faixa de m/z 50-2000.

4.9 TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO (HTS)

4.9.1 REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos foram reativados em tubos de ensaio durante 24 horas. As colônias desenvolvidas foram removidas com o auxílio de uma espátula estéril e transferidos para tubos *Eppendorf* de 1,5 mL, onde foram pesadas. As células foram

suspensas em solução tampão borato 20 mM pH 8,8 de forma a obter concentrações de 0,2 mg/mL.

4.9.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA TRIAGEM

4.9.2.1 Soluções estoque das sondas fluorogênicas para monooxigenases e hidrolases

Inicialmente preparou-se soluções estoque para as sondas de monooxigenases e hidrolases em acetonitrila pura na concentração de 20 mM. Estas soluções foram diluídas em H₂O:CH₃CN (1:1, v/v) para compor as soluções trabalho na concentração de 2 mM. Todas as soluções foram armazenadas em geladeira.

4.9.2.2 Solução tampão borato

Para o preparo da solução de tampão borato 20 mM a pH 8,8, adicionou-se 50 mL de uma solução estoque de ácido bórico, H₃BO₃, 0,2 mol/L (preparado pela dissolução de 112,40 g do ácido em 1,0 L de água Milli-Q), em um volume adequado de solução estoque de bórax 0,05 mol/L (preparado pela dissolução de 19,08 g em 1,0 L de água Milli-Q) de acordo com o pH de interesse (Holmes, 1943) [Tabela 52]. Esta mistura foi dissolvida em um volume total de 200 mL.

Tabela 52. Volume e pH utilizados para o preparo da solução tampão bórico-bórax

Solução Bórax	pH	Solução Bórax	pH
0,05 mol/L (mL)		0,05 mol/L (mL)	
2,0	7,6	22,5	8,7
3,1	7,8	30,0	8,8
4,9	8,0	42,5	8,9
7,3	8,2	59,0	9,0
11,5	8,4	83,0	9,1
17,5	8,6	115,0	9,2

Para comprovar o valor do pH da solução tampão preparada, fez-se a medida do pH utilizando-se um pHmetro (pH 300 M *Analyser*).

4.9.2.3 Solução de periodato de sódio

Para preparar a solução de periodato na concentração de 20 mM, dissolveu-se 4,30 mg de periodato de sódio, NaIO_4 , em 1 mL de água Milli-Q. Esta solução sempre foi preparada minutos antes do experimento

4.9.2.4 Solução de BSA

Para preparar a solução de BSA na concentração final da reação de 2 mg/mL, utilizou-se quantidades diferentes de BSA para os ensaios de monooxigenases e hidrolases, como segue:

- Monooxigenase: dissolveu-se 4,40 mg de BSA em 1 mL de solução tampão borato;
- Hidrolases: dissolveu-se 5,00 mg de BSA em 1 mL de solução tampão borato.

As soluções foram submetidas a agitação suave para evitar a formação de espuma.

4.9.3 TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO (HTS)

Os microrganismos foram reativados em tubos de ensaio, transferidos para tubos *Eppendorf* e as células ressuspensas em solução tampão borato (*seção 4.9.2.2, pág.293*), obtendo-se suspensões celulares de 0,2 mg/mL. Os ensaios foram montados em micropalcos de polipropileno com 96 cavidades (Costar 3363, fundo plano), as quais foram tampadas durante a aquisição da leitura de fluorescência realizada em temperatura ambiente. As medidas foram feitas em duplicata seguindo o procedimento detalhado abaixo para monoOxigenases e hidrolases.

4.9.3.1 Detecção de Baeyer-Villiger Monooxigenases

Foram utilizados quatro substratos (sondas) fluorogênicos [*Esquema 1, pág. 48*] e quatro produtos para detecção desta atividade. Os ensaios foram realizados segundo metodologia descrita por Badalassi *et al.* (2000), adaptada por nosso grupo de pesquisa à investigação de células microbianas íntegras, como segue:

➤ **Ensaio:** adicionou-se, na microplaca, 10 µL dos substratos na concentração de 0,1 mM; 90 µL de BSA 4,40 mg/mL e 100 µL das suspensões microbianas, 0,5 mg/mL (células + solução tampão borato pH 8,8, 20 mM);

➤ **Controle positivo:** 10 µL dos produtos, 90 µL de BSA e 100 µL da suspensão microbiana;

➤ **Controle negativo:** 10 µL de sonda, 90 µL de BSA e 100 µL de solução tampão borato pH 8,8 (20 mM);

➤ **Controle microbiano:** 10 μL de solução tampão, 90 μL de BSA e 100 μL de suspensão microbiana.

4.9.3.2 Detecção de epóxido-hidrolases, esterases e lipases

Para este ensaio foram utilizados dois substratos para a detecção de epóxido-hidrolases, dois para esterases e um para detecção de enzimas lipases e seus respectivos produtos como controle positivos [*Esquema 1, pág.48*]. A metodologia utilizada para os ensaios foi a seguinte:

➤ **Ensaio:** adicionou-se 10 μL dos respectivos substratos, 0,1 mM, 80 μL de BSA e 110 μL de suspensão microbiana, 0,5 mg/mL (células + NaIO_4 , 2 mM);

➤ **Controle positivo:** 10 μL do produto, 80 μL de BSA e 110 μL da suspensão microbiana;

➤ **Controle negativo:** 10 μL de substrato, 80 μL de BSA e 110 μL de solução tampão com NaIO_4 (100 μL de tampão borato + 10 μL de NaIO_4);

➤ **Controle microbiano:** 10 μL de solução tampão, 80 μL de BSA e 110 μL de suspensão microbiana.

4.9.4 CURVA DE CALIBRAÇÃO DA UMBELIFERONA

A conversão dos substratos após leitura de fluorescência foi determinada transformando a diferença na intensidade de fluorescência entre a amostra e o controle branco, em concentração de umbeliferona, utilizando uma curva de calibração preparada a partir de diluições de uma solução estoque de 20 mM de umbeliferona nas concentrações finais de 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 125,0 e 150,0 μM em $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) na presença de 80 μL BSA (5,0 mg/mL) em 100 μL de

tampão borato 20 mM (pH 8,8) e 10 μ L de solução aquosa de NaIO₄ (20 mM) [Figura 114].

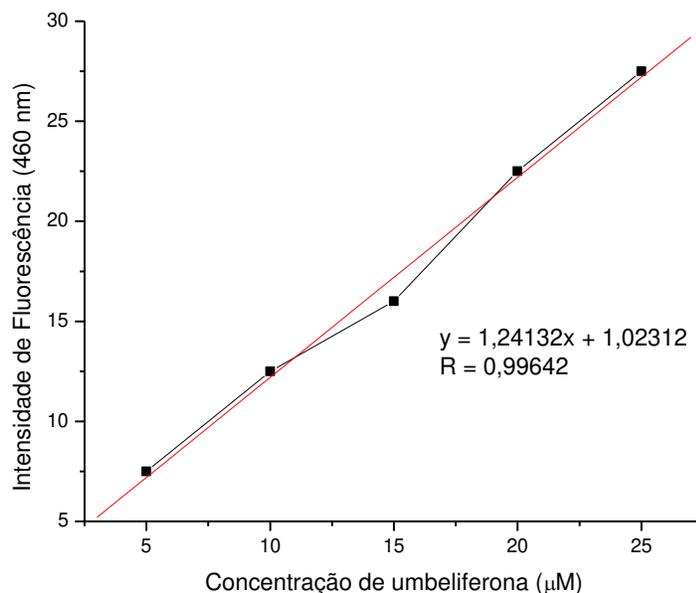


Figura 114. Curva de calibração utilizada na conversão das intensidades de fluorescência em concentração de umbeliferona nos ensaios de HTS.

4.9.5 METODOLOGIA PARA MULTIBIOREACÃO

Adicionou-se 2 g de precipitado celular a 50,0 mL de meio Zinder (pH 7,2) contendo 0,5 mL de vitaminas e 10,0 mg de cada composto testado (cânfora, cis-jasmona). A multibioreação foi monitorada por 192 h. As amostras (1 mL) foram saturadas com cloreto de sódio e extraída com AcOEt (3 x 1000 μ L). O solvente foi evaporado e o resíduo orgânico foi diluído em 1 mL de AcOEt adicionado de 10 μ L de pentadecano (padrão interno, 0,05 μ g/mL) e analisados por CG-EM. As análises por CG-EM foram feitas usando um espectrômetro HP 5970-MSD (70 eV) e Hélio como gás de arraste (fluxo constante de 1 mL/min., splitless 50) A coluna usada foi do tipo

MDN5S (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e a programação de temperatura foi: 50 °C/5 min. até 225 °C a 10 °C/min., seguido para 30 °C/min. até 290 °C, permanecendo por 10 min.

5. CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

O estudo sobre produção de biossurfactantes e atividade enzimática dos microrganismos recuperados de amostras de petróleo, e suas preferências metabólicas durante o processo de biodegradação do petróleo realizados neste trabalho produziram resultados inéditos e importantes.

1- A análise das seqüências parciais de DNAr 16S obtidas, através da comparação com seqüências de organismos já identificados e depositados em bases de dados, revelou a presença de bactérias dos gêneros *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Mezorhizobium* e *Bordetella* para as bactérias presentes no consórcio. A mesma análise realizada para o consórcio anaeróbico revelou que os microrganismos são pertencentes apenas aos gêneros *Bacillus* e *Acinetobacter* e para o consórcio misto, a análise dos clones revelou a presença de *Brevibacterium*, *Achromobacter* e *Bacillus* também presentes nos consórcios aeróbico e anaeróbico, além de 50 % de bactérias do gênero *Stenotrophomonas* e 6 % de *Rhizobium*. Todas as bactérias identificadas tanto nos isolados quanto nos consórcios são descritas na literatura como degradadoras de hidrocarbonetos e/ou associadas a ambientes contaminados com óleo e com capacidade de sobreviver em ambientes com baixo ou alto teor de oxigênio.

2- O estudo da atividade enzimática e das multibioreações revelou que as bactérias isoladas e seus respectivos consórcios apresentam atividades catalíticas que caracterizam os processos de biodegradação do petróleo (oxidoredutases e hidrolases).

3- Nos experimentos de biodegradação foi possível verificar que os consórcios biodegradam os componentes do petróleo de forma diferenciada e por ação sinérgica. Nas condições de aerobiose estudadas, independente da dispersão do petróleo no meio ou adsorvido em matrizes, a suscetibilidade de biodegradação para as classes de biomarcadores analisadas segue a ordem: hidrocarbonetos > hopanos e homohopanos

(com enriquecimento de 25-norhopanos) > esteranos > terpanos tricíclicos. Sendo que para os homohopanos houve preferência pelos homólogos de maior peso molecular $C_{35} > C_{34} > C_{33} > C_{32} > C_{31}$ e a biodegradação dos esteranos seguiu a ordem $\alpha\alpha\alpha\ 20R \gg \alpha\beta\beta\ 20R + \alpha\beta\beta\ 20S \geq \alpha\alpha\alpha\ 20S \gg$ diasteranos, diminuindo com o número de carbonos [$C_{27} > C_{28} > C_{29}$].

Após análise das taxas de biodegradação e de todos os parâmetros estudados e considerando as condições de anaerobiose utilizadas nestes experimentos foi possível sugerir a seguinte preferência de biodegradação para os anaeróbios: hidrocarbonetos > esteranos > hopanos e homohopanos > 25-norhopanos > terpanos tricíclicos. Para os homohopanos a ordem de degradação foi contrária à observada para os aeróbios, ou seja, em condições anaeróbias houve preferência pelos homólogos de menor peso molecular, $C_{31} > C_{32} > C_{33} > C_{34} > C_{35}$. Para os esteranos observou-se a mesma ordem relatada para os aeróbios, $\alpha\alpha\alpha\ 20R \gg \alpha\beta\beta\ 20R + \alpha\beta\beta\ 20S \geq \alpha\alpha\alpha\ 20S \gg$ diasteranos, diminuindo com o número de carbonos [$C_{27} > C_{28} > C_{29}$].

Baseado nos resultados obtidos para o consórcio misto foi possível sugerir a ordem preferencial de degradação de hidrocarbonetos > hopanos > esteranos > 25-norhopanos > terpanos tricíclicos, até 90 dias de ensaio. De 120 a 180 dias observou-se uma inversão na ordem entre hopanos e esteranos, sempre com oscilações entre características aeróbias e anaeróbias. A presença de microrganismos aeróbios estritos e aeróbios facultativos na microbiota mista permite inferir que a hipótese sugerida neste trabalho (o petróleo é biodegradado por um consórcio misto entre microrganismos aeróbios e anaeróbios) é satisfatória nas condições experimentais utilizadas, necessitando, porém de mais estudos para confirmar realmente tal fato.

4- A investigação dos EPS mostrou que, ao contrário do que ocorre em culturas puras, em consórcios as bactérias produzem e biodegradam o petróleo devido à associação natural que existe entre as comunidades microbianas presentes no petróleo. Observou-se, ainda, que a produção destes biossurfactantes pelos consórcios aeróbios

auxilia os processos de biodegradação. Sendo que o principal surfactante identificado foi a surfactina que é reconhecidamente produzido por cepas de *Bacillus subtilis*.

Uma das principais conclusões deste trabalho está no fato de termos recuperado consórcios indígenas do petróleo a partir de amostras do Campo de Pampo Sul com diferentes níveis de biodegradação e profundidades cujo poder de degradação reflete com fidelidade o processo que ocorre no reservatório, de acordo com os parâmetros calculados e com os perfis cromatográficos analisados. Além disso, este é o primeiro relato do uso de uma microbiota mista envolvida nos processos de biodegradação do petróleo e o primeiro trabalho a utilizar petróleo adsorvido em diferentes matrizes para fazer simulações de biodegradação.

A integração de todos os resultados desta investigação demonstram que os consórcios avaliados podem degradar de maneira eficiente o petróleo *in vitro* de maneira muito semelhante à observada *in vivo*, indicando que a mimetização do processo foi eficiente, mesmo considerando a grande diferença de tempo envolvido nos dois casos. Além disso, é importante destacar que os experimentos de simulação de biodegradação em laboratório podem promover um melhor entendimento sobre os mecanismos e processos de biodegradação e as preferências metabólicas dos microrganismos que poderão servir para aprimorar as explicações a biodegradação que ocorre nos reservatórios e que afetam as características físico-químicas dos óleos, e conseqüentemente gera impactos econômicos muito significativos à produção petrolífera.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalos, A.; Pinazo, A.; Infante, M. R.; Casals, M. Garcia, F.; Manresa, A. *Langmuir*. **2001**, 17, 1367-1371.
- Aeckersberg, F.; Bak, F.; Widdel, F. *Archives Microbiology*. **1991**, 156, 5-14.
- Aeckersberg, F.; Rainey, F.; Widdel, F. *Archives Microbiology*. **1998**, 170, 361-369.
- Aitken, C. M.; Jones, D. M.; Larter, S. R. *Nature*. **2004**, 431, 291-291.
- Alexander, R.; Kagi, R. I.; Woodhouse, G. W.; Volkman, J. K. *Australian Petroleum Exploration Association Journal*. **1983b**, 23, 53-63.
- Alexander, R.; Kagi, R.; Woodhouse, G. W. *Association of Petroleum Geologists Bulletin*. **1981**, 65, 235-250.
- Andreoni, V.; Bernasconi, S.; Colombo, M.; van Beilen, J. B.; Cavalca, L. *Environmental Microbiology*. **2000**, 2, 572-577.
- Aquino Neto, F. R.; Trendel, J. M.; Restlé, A.; Albrecht, P. A. 1983. In: *Advances in Organic Geochemistry*. **1981** (M. Bjoroy, C. Albrecht, C. Cornford, et al., eds.), John Wiley & Sons, New York, 659-676.
- Atlas, R. M. *Microbiology Review*. **1981**, 45(1), 180-209.
- Atlas, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*. **1995**, Oxford, 31, 178-182.
- Badalassi, F.; Wahler, D.; Klein, G.; Crotti, P.; Reymond, J-L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4067.
- Bade, k.; Manz, W.; Szewzyk, U. *FEMS Microbiology Ecology*. **2000**, 215-223.
- Ball, H. A.; Johnson, H. A.; Reinhard, M.; Spormann, A. M. J. *Bacteriology*. **1996**, 178, 5755-5761.
- Banat, I, M; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S. *Applied Microbiology Biotechnology*. **2000**, 53, 495-508.
- Banat, I. M. *Bioresource Biotechnology*. **1995**, 51, 1-12.

- Banat, I. M.; Samarah, N.; Murad, M.; Horne, R.; Benerjee, S. *World Journal Microbiology Biotechnology*. **1991**, 7, 80-84.
- Behar, F.; Albrecht, P. *Organic Geochemistry*. **1984**, 6, 597-674.
- Benincasa, M.; Abalos, A.; Oliveira, I.; Manresa, A. *Antonie van Leeuwenhoek*. **2004**, 85, 1-8.
- Bento, F. M. et al. *Brazilian Journal of Microbiology*. **2003**, 34(1), 65-68.
- Bergey, D.H. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*. Vol. 1. 2^a ed. Baltimore, William & Wilkins, **2001**, p. 369-382.
- Berthe-Corti, L.; Fetzner, S. *Acta Biotechnology*. **2002**, 3-4, 299-336.
- Berthe-Corti, L.; Höpner, T.; Paleo. **2005**, 219, 171-189.
- Bieszkiewicz, E.; Horoch, M.; Boszczyk-Maleszak, H.; Mycielski, R. *Acta Microbiologica Polonica*. **1998**, 47, 305-312.
- Blanc, P.; Connan, J. In: The Petroleum System – From Source to Trap (L. B. Magoon & W. G. Dow, eds.) *American Association of Petroleum Geologists*. **1994**, Tulsa, OK, p. 237-247.
- Blumenkratz, N.; Asboe-Hansen, G. *Analytical Biochemistry*. **1973**, 54, 484-489.
- Bognolo, G. *Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects*. **1999**, Amsterdam, 152, 41-52.
- Bonch-Osmolovskaya, E. A.; Miroshnichenko, M. L.; Lebedinsky, A. V.; Chernyh, N. A.; Nazina, T. N.; Ivoilov, V. S.; Belyaev, S. S.; Boulygina, E. S.; Lysov, Y. P.; Perov, A. N.; Mirzabekov, A. D.; Hippe, H.; Stackebrandt, E.; L'Haridon, S.; Jeanthon, C. *Applied and Environmental Microbiology*. **2003**, 69, 6143-6151.
- Bonin, P.; Cravo-Laureau, C.; Michotey, V.; Hirschler-Rea, A. *Ophelia*. **2004**, 58, 243-254.
- Bornscheuer, U. T. *FEMS Microbiology Reviews*. **2002**, 26, 73-81.
- Borzenkov, I. A.; Milekhina, E. I.; Gotoeva, M. T.; Rozanova, E. P.; Beliaev, S. S. *Mikrobiologiya*. **2006**, 75, 82-89.

Bost, F.D.; Frontera-Suau, R.; McDonald, T.J.; Peters, K.E.; Morris, P.J. *Organic Geochemistry*. **2001**, 32, 105–114.

Bradford, M.M. *Analytical Biochemistry*. **1976**, 72, 248254.

Brocks, J. J.; Buick, R.; Summons, R. E.; Logan, G. A. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **2003a**, 67(22), 4321-4335.

Brocks, J. J.; Love, G. D.; Snape, C. E.; Logan, G. A.; Summons R. E.; Buick, R. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **2003b**, 67(8), 1521-1530.

Brooks, P.W.; Fowler, M.G.; MacQueen, R.W. *Organic Geochemistry*. **1988**, 12, 519-538.

Calvo, C.; Toledo, F. L.; Gonzáles-López, J. *Journal Biotechnology*. **2004**, 109, 255-262.

Cameotra, S. S.; Makkar, R. S. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **1998**, 50, 520.

Castro, H. F.; Williams, N. H.; Ogram, A. *FEMS Microbiology Ecology*. **2000**, 31, 1-9.
Chaerun, S. K.; Tazaki, K.; Asada, R.; Kogure, K. *Environmental International*. **2004**, 30, 911-922.

Chaillan, F.; Flèche, A.; Bury, E.; Phantavong Y.; Grimont P.; Saliot A.; Oudot, J. *Research in Microbiology*. **2004**, 155, 587–595.

Chosson, P.; Connan, J.; Dessort, D.; Lanau, C. In: *Biological Markers in Sediments and Petroleum* (J. M. Moldowan; P. Albrecht and R. P. Philp, eds.), Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. **1992**, pp. 320-349.

Chosson, P.; Lanau, C.; Connan, J. ; Dessort, D. *Nature*. **1991**, 351, 640-642.

Christofi, N.; Ivshina, I. B. *Journal of Applied Microbiology*. **2002**, 93, 915-929.

Churchill, S. A.; Harper, J.P.; Churchill, P. F. *Environmental Microbiology*. **1999**, 65, 549-552.

Coates, J. D. *Applied Environmental and Microbiology*. **1999**, 65, 5234-5241.

- Coates, J. D.; Bhupathiraju, V. K.; Achenbach, L. A.; McInerney, M. J.; Lovely, D. R. *International Journal Syst Bacteriol.* **2001**, 51, 581-588.
- Coates, J. D.; Woodward, J. Allen, J.; Philip, P.; Lovley, D. R.; *Applied and Environmental Microbiology.* **1997**, 63, 3589-3593.
- Colleran, E.; Finnegan, S.; Lens, P. *Anaerobic treatment of sulfate-containing waste streams*, **1994**. Department of Microbiology University College, Galway, Republic of Ireland.
- Connan, J. In: *Advances in Petroleum Geochemistry.* **1984**, Vol. 1 (J. Brooks & D. H. Weltes, eds.), Academic Prees, London, p. 299-335.
- Connan, J.; Restle, A.; Albrecht, P. *Advances Organic Geochemistry.* **1980**, 12, 1-17.
- Cooper, D.G.; Goldenberg, B.G. *Applied Environmental and Microbiology.* **1987**, 53, 224-229.
- Cord-Ruwich, R.; Kleinitz, W.; Widdel, F. *Journal of Petroleum Technology.* **1987**, 1, 97-106.
- Costa, S. G. V. A. O.; Nitschcke, M.; Haddad, R.; Eberlin, M. N.; Contieiros, J. *Process Biochemistry.* **2006**, 41, 483-488.
- Cravo-Laureau, C.; Grossi, V.; Raphael, D.; Matheron, R.; Hirschler-Réa, A. *Applied and Environmental Microbiology.* **2005**, 3458-3467.
- Cravo-Laureau, C; Matheron, R.; Cayol, J. L.; Jouliau, C.; Hirschler-Rea, A. *Int Journal Syst Evol Microbiology.* **2004**, 54, 77-83.
- Crueger, W.; Crueger, A. *Biotechnology: a text book of industrial microbiology.* Madison, Science Techology, p. 297, **1984**.
- Da Cruz, G. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. *Organic Geochemistry.* **2008**, 39, 1204-1209.
- Da Silva, A. A. *Tese de Doutorado.* Instituto de Química/UNICAMP. **2008**.
- Desai, J. D.; Banat, I. M. *Microbiology Molecular Biology Review.* **1997**, 61(1), 47-64.

- Déziel, E.; Lépine, F.; Milot, S.; Villemur, R. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2000**, 1485, 145-152.
- Didyk, B. M., Simoneit, B. R. T., Brassell, S., Eglington, G. *Nature*. **1978**, 272, 216-222.
- Donoghue, N.A.; Norris, D.B.; Trudgill, P.W. *European Journal Biochemistry*. **1976**, 63, 175-192.
- Dubey, K.; Juwarkar, A. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2001**, 17, 61-69.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. *Analytical Chemistry*. **1956**, 28, 350-356.
- DuTeau, N. M.; Rogers, J. D.; Bartholomay, C. T.; Reardon, K. F. *Applied and Environmental Microbiology*. **1998**, 64, 4994-4999.
- Ehrenreich, P.; Behrends, A.; Harder, J.; Widdel, F. *Archives of Microbiology*. **2000**, 173, 58-64.
- Ensign, S. A.. *Biochemistry*. **2001**, 40, 5845-5853.
- Eullkötter, J.; Wendisch, D. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **1982**, 46, 1543-1553.
- Evans, C. R.; Rogers, M. A.; Bailey, N. J. L. *Chemical Geology*. **1971**, 8, 147-170.
- Evans, P. J.; Ling, W.; Goldschmidt, B.; Ritter, E. R.; Young, L. Y.; *Applied Environment Microbiology*. **1992**, 58, 496-501.
- Ferreira, J. C. *Boletim de Geociências da Petrobras*. **1993**, v.7(1), p. 147-156.
- Fiechter, A. *TREND Biotechnology*. **1992**, 10, 208-217.
- Flemming, H. C.; Wingender, J. Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance, p. 1223-1231. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*. **2002**, vol. 3. Wiley, New York, NY.
- Fritsche, W.; Hofrichter, M. In: *Biotechnology*. **2000**, Vol. 11b (J. Klein, ed.), John Wiley & Sons, New York, p. 146-164.

- Fuenmayor, S. L.; Wild, M.; Boyes, A. L.; Williams, P. A. *Journal Bacteriology*. **1998**, 180, 2522-2530.
- Gonçalves, R. A. C.; Porto, A. L. M.; Pinheiro, L.; Cagnon, J. R.; Manfio, G. P.; Marsaioli, A. J. *Food Technology Biotechnology*. **2004**, 42, 355-361.
- Goodwin, N. S.; Park, P. J. D.; Rawlinson, A. P. **1983**. In: BJORROY, M. et al.(Ed.), *Advances Organic Geochemistry*. **1981**. J.Wiley and Sons, New York, p.650-658.
- Grossi, V.; Cravo-Laureau, C.; Guyoneaud, R.; Ranchou-Peyruse, A.; Hirschler-Réa, A. *Organic Geochemistry*. **2008**, 39, 1197-1203.
- Guardado, L. R.; Gamboa, L. A. P.; Luchesi, C. F. In: J. D. Edwards, P. A. Santogrossi (eds), *Divergent/Passive Margin Basins. American Association of Petroleum Geologists*. **1989**, Memmoir, 48, 3-79.
- Guardado, L. R.; Spadini, A. R.; Brandão, J. S. L.; Mello, M. R. *American Association of Petroleum Geologists*. **2000**, Memoir 73, chapter, 22, 1, 317-324.
- Haba, E.; Pinazo, A.; Jáuregui, O.; Espuny, M. J.; Infante, M. R.; Manresa, M. A. *Biotechnology and Bioengineering*. **2003**, 81, 316-322.
- Hauser, A.; Dashti, H. *Fuel*. **1999**, 78, 1483-1488.
- Hawle-Ambrosch E, Riepe W, Dornmayr-Pfaffenhuemer M, Radax C, Holzinger A, Stan-Lotter H. *Biotechnology Journal*. **2007**, 2(12), 1564-8.
- Head, I. M.; Jones, D. M.; Larter, S. R. *Nature*. **2003**, 426, 344-352.
- Hoffmann, C. F.; Strausz, O. P. *American Association of Petroleum Geologists Bulletin*. **1986**, 70, 1113-1128.
- Holba, A. G.; Dzou, L. I.; Wood, G. D.; Ellis, L.; Adam, P.; Schaeffer, P.; Albrecht, P. Greene, T.; Hughes, W. B. *Organic Geochemistry*. **2003**, 34(3), 441-469.
- Holba, A. G.; Dzou, L. *Organic Geochemistry*. **2004**, 34, 441-469.
- Holland, K. T.; Knapp, J. S.; Shoosmith, J. G. *Anaerobic Bacteria*, 1th ed., Blackie & Son, New York, **1987**.

Holmes. *Anat Rec.* **1943**, 86, 163.

Hsieh, F.; Li, M.; Lin, T.; Kao, S. *Current Microbiology.* **2004**, 49, 186.

Jafé, R.; Gallardo, M. T. *Organic Geochemistry.* **1993**, 20 (7), 973-984.

Johnsen, A. R.; Bendixen, K.; Karlson, U. *Applied Environmental Microbiology.* **2002**, 68 (6), 2683-2689.

Jones, D. M. ; Head, I. M. ; Gray, N. D. ; Adams, J. J. ; Rowan, A. K. ; Aitken, C. M. ; Bennett, B. ; Huang, H. ; Brown, A. ; Bowler, B. F. J. ; Oldenburg, T. ; Erdmann, M. ; Larter, S. R. *Nature Letters.* **2008**, 451, 176-180.

Kamembeek, N.M.; Janssen, D.B.; van Berkel, W.J.H.; Fraaije, M.W. *Advances Synthesis Catalalysis.* **2003**.

Kato, T.; Haruki, M.; Imanaka, T.; Morikawa, M.; Kanaya, S. J. *Bioscience Bioengenieer.* **2001**, 91, 64-70.

Khan, A. A.; Wang, R. F.; Cao, W. W.; Doerge, D. R.; Wennerstrom, D.; Cerniglia, C. E. *Applied and Environmental Microbiology.* **2001**, 67, 3577-3585.

Killops, S. D.; Killops, V. J. *An Introduction to Organic Geochemistry.* **1993**, John Wiley & Sons, Inc. First Edition, New York, USA, 1-265.

Kleber, H. P.; Claus, R.; Asperger, O. *Acta Biotechnology.* **1983**, 3, 251-260.

Korda, A.; Santas, P.; Tenente, A.; Santas, R. *Applied and Environmental Microbiology.* **1997**, 48, 677-686.

Kowall, M.; Valter, J.; Kluge, B.; Stein, T.; Franke, P.; Ziessow, D. J. *Colloid Interface Science.* **1998**, 204, 1.

Kropp, K. G.; Davidova, I. A.; Suflita, J. M. *Applied and Environmental Microbiology.* **2000**, 66, 5393-5398.

Krüß. Processor Tensiometer K12. Hamburg. Manual, **1994**.

Kuo, L.-C. *Organic Geochemistry.* **1994b**, 21,465-479.

- Lal, B.; Khanna, S. J. *Applied Bacteriology*. **1996**, 81, 355-362.
- Lang, S. *Current Opinion Colloid Interface Science*. **2002**, 7, 12.
- Lima, S. G. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas-SP, Brasil, **2005**.
- Lopes, A. L. M. *Dissertação de Mestrado*. **2004**, Universidade Federal Fluminense – UFF. Niterói, RJ. 68 p.
- Lopes, J. A. D.; Santos Neto, E. V.; Mello, M. R.; Koike, L.; Marsaioli, A. J.; Reis, F. A. M. *Chemical Geology*. **1999**, 158, 1-20.
- Mackenzie, A. S.; Wolf, G. A.; Maxwell, J. R. In: *Advances in Organic Geochemistry*. **1981**, (ed. Bjoroy, M. et al.), p. 637-649, Wiley, Chichester.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. *Brock Biology of Microorganisms*. 8^a ed. New Jersey, Prentice-Hall. **1997**, p. 606-768.
- Magoon, L. B.; Dow, W. G. In: *The petroleum system - from source to trap*. **1994**, Magoon L. B.; Dow, W. G. ed. AAPG Memoir 60, p. 3-24.
- Magoon, L. B.; Dow, W. G. The petroleum system. In: *The petroleum system - from source to trap*. **1994**, Magoon, L. B., Dow, W. G. ed. AAPG Memoir 60, p. 3-24.
- Magot, M.; Ollivier, B.; Patel, B. K. C. *Antonie van Leewenhock*. **2000**, 77, 103-116.
- Maier, R. M. *Advances Applied Microbiology*. **2003**, 52, 101.
- Makkar, R. S.; Cameotra, S. S. *Journal American Oil Chemical Society*. **1997**, 74 (7), 887-889.
- Martínez-Checa, F.; Toledo, F. L.; Mabrouki, K. El.; Quesada, E.; Calvo, C. *Bioresource Technology*. **2007**, 98, 3130-3135.
- Martín-Gil, J.; Navas-Gracia, L. M.; Gómez-Sobrino, E.; Correa-Guimarães, A.; Hernández-Navarro, S.; Sánchez-Báscones, M.; del Carmen Ramos-Sánchez, M. *Bioresource Technology*. **2008**, 99(6),1821-1829.

Mello, M. R.; Telnaes, N.; Gaglianone, P. C.; Chicarelli, M. I.; Brassell, S. C.; Maxwell, J. R. *Organic Geochemistry*. **1988a**, 13(1-3), 31-45.

Mihovilovic, M.D.; Müller, B.; Stanetty, P. *European Journal Organic Chemistry*. **2002**, 22, 3711-3730.

Milani, E. J.; Brandão, J. A. S. L.; Zalán, P. V.; Gamboa, L. A. P. *Brazilian Journal of Geophysics*. **2000**, 18(3), 351-396.

Milles, J.A. *Illustrate glossary of petroleum geochemistry*, Oxford Science Publications, Oxford, **1989**.

Mischitz, M.; Faber, K. *Synlett*. **1996**, 10, 978-980.

Mohriak, W. U.; Mello, M. R.; Karner, G. D.; Dewey, J. F.; Maxwell, J. R. *American Association of Petroleum Geologist*. **1989**, Memoir 46, chapter 38, p. 577-598.

Mohriak, W. U.; Macedo, J. M.; Castellani, R. T.; Rangel, H. D.; Barros, A. Z. N.; Latgé, M. A. L.; Ricci, J. A.; Misuzaki, A. M. P.; Szatmari, P.; Demercian, L. S.; Rizzo, J. G.; Aires, J. R. In: M. P. A. Jackson, D. G. Roberts, S. Snelson (eds.), *Salt tectonics: a global perspective*. **1995**, AAPG Memoir 65, p. 273-304.

Monteiro, S. A.; Sasaki, G. L.; Souza, L. M.; Meira, J. A.; Araújo, J. M.; Mitchell, D. A.; Ramos, L. P.; Krieger, N. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2007**, 147, 1-13.

Mulligan, C. N. *Environmental Pollution*. **2005**, 133, 183-198.

Mulligan, C. N.; Eftekhari, F. *Engineering Geology*. **2003**, 70, 269-279.

Munoz, D. et al., *Marine Pollution Bulletin*. **1997**, 34, 868-874.

Nitschke, M.; Pastore, G. M. *Química Nova*. 2002, 25 (5), 772-776.

Nitschke, M.; Siddhartha, G. V. A.; Costa, O.; Contiero, J. *Biotechnology Progress*. **2005**, 21, 1593-1600.

Orihara, Y.; Noguchi, T.; Kitajima, J. *Chemical Pharmacia Bulletin*, **2003**, 51, 32-39.

Orphan, V.J.; Taylor, L.T.; Hafenbradl, D.; Delong, E.F. *Applied and Environmental Microbiology*. **2000**, 66, 700-711.

- Oude Elferink, S. J. W. H.; Rinia, H. A.; Bruins, M. E.; de Vos, W. M.; Stams, A. J. M. *Journal Applied Microbiology*. **1997**, 83, 102-110.
- Oude Elferink, S. J. W. H.; Visser, A.; Hulshoff, L. W.; Stams, A. J. M. *FEMS Microbiology review*. **1994**, 15, 119-136.
- Ourisson, G.; Albrecht, P.; Rohmer, M. *Scientific American*. **1984**, 251, 34-41.
- Palmer, S. E. *186th National Convention of the American Chemical Society*, August, **1983**, Washington, DC.
- Passos, P. R. A. *Dissertação de Mestrado*. UFRJ. **1993**.
- Pereira, M. J.; Trindade, L. A. F.; Gaglianone, P. C. *XXXIII Congresso Brasileiro de Geologia, Anais*. **1984**, Rio de Janeiro, RJ, v.10, p. 4763-4777.
- Perrin, D. D.; Amarego, W. L. F.; Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*, 2th Ed., Pergamon Press, New York, **1980**.
- Peters, K. E.; Moldowan, J. M. *Organic Geochemistry*. **1991**, 17(1), 47-61.
- Peters, K. E.; Moldowan, J. M. *The Biomarker Guide: Interpreting molecular fossil in petroleum and ancient sediments*. **1993**. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Peters, K. E.; Walters, C. C.; Moldowan, J. M. *The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History*. **2005**, vol. 1, 2nd Ed, Cambridge University Press.
- Petterson, B.; Lembke, F.; Hammer, P.; Stackebrandt, E.; Priest, F.G. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **1996**, 46, 759-764.
- Philp, P. R.; Gilbert, T. D.; Friederich, J. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **1981**, 45, 1173-1180.
- Philp, R. P. *Fossil Fuel Biomarkers*. **1985**. Elsevier, New York.
- Pineda-Flores, G.; Boll-Arguello, G.; Lira-Galeana, C.; Mesta-Howard, A.M. *Biodegradation*. **2004**, 15, 145-151.

Pinheiro, L. Tese de Doutorado. Instituto de Química/UNICAMP, **2006**.

Quesada, E., Béjar, V., Calvo, C.; *Experimentia* **1993**, 49, 1037-1041.

Rabus , R.; Wilkes, H.; Behrends, A.; Armstroff, A.; Fischer, T.; Pierik, A. J.; Widdel, F. *Journal Bacteriology*. **2001**, 183, 1707-1715.

Radke, M. *Organic geochemistry*. **1987**, In: Advances in Petroleum Geochemistry, eds J. Brooks and D.H. Welte, pp 141-207. Academic 127 Press, London, 1987.

Radwan, S. S.; Sorkhoh, N. A.; Felzmann, H.; El-Desouki, A. F. J. *Applied Bacteriology*. **1996**, 80, 370-374.

Rahman, K. S. M.; Rahman, T. J.; Kourkoutoas, Y.; Petsas, I.; Marchant, R.; Banat, I. M. *Bioresource Technology*. **2003**, 90, 159-168.

Rahman, K. S. M.; Rahman, T. J.; McClean, S.; Marchant, R.; Banat, I. M. *Biotechnology Progress*. **2002**, 18, 1277-1281.

Rangel, H. D.; Martins, C. C. *Principais compartimentos exploratórios, Bacia de Campos*. In: (ed.) Searching for Oil and Gas in the Land of Giants. Rio de Janeiro. Schlumberger p.32-40, **1998**.

Rebouças, L. M. *Tese de Doutorado*. Instituto de Química/UNICAMP. **1992**.

Restlé, A. *O Petróleo – Tradução e adaptação*: Mello, M. R.; Hessel, M. A.; Soldan, A. L. **1994**. Petrobrás/CENPES, RJ.

Rickard, A. H.; Gilbert, P.; High, N. J.; Kolenbrander, P. E.; Handley, P. S. *TRENDS in Microbiology*. **2003**, 11 (2), 94-100.

Rockne, K. J.; Chee-Sanford, J. C.; Sanford, R. A.; Hedlund, B. P.; Staley, J. T. *Applied and Environmental Microbiology*. **2000**, 66, 1595-1601.

Rodrigues, D.C. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas-SP, Brasil, **2000**.

Röling, W. F. M.; Head, I. M.; Larter, S. R. *Research in Microbiology*. **2003**, 321-328.

Ron, E. Z.; Rosenberg, E. *Environmental Microbiology*. **2001**, 3, 229-236.

- Rueter, P.; Rabus, R.; Wilkes, H.; Aeckersberg, F.; Rainey, F. A.; Jannasch, H. W.; Widdel, F. *Nature*. **1994**, 372, 455-458.
- Rullkötter, J.; Wendisch, D. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **1982**, 46, 1543-1553.
- Said, O. B.; Goñi-Urriza, M. S.; Bour, M. E.; Dellali, M.; Aissa, P.; Duran, R. *Journal of Applied Microbiology*. **2008**, 104, 987-997.
- Saito, A.; Iwabuchi, T.; Harayama, S. *Journal Bacteriology*. **2000**, 182, 2134-2141.
- Sakai, Y.; Maeng, J. H.; Tani, Y.; Kato, N. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. **1994**, 58, 2128-2130.
- Samanta, S. K.; Singh, O. V.; Jain, R. K. *TRENDS in Biotechnology*. **2002**, 20(6), 243-248.
- Sass, H.; Wieringa, E.; Cypionka, H.; Babenzien, H-D; Overmann, J. *Archives Microbiology*. **1997**, 170(4), 243-251.
- Schmitt, L.; Forsans, T.; Santarelli, F. J. *International Journal Rock Mechanist Mineral Science & Geochemist*. **1994**, 31(5), 411-427.
- Seifert, W. K.; Moldowan, J. M. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **1979**, 43, 111-126.
- Seifert, W. K.; Moldowan, J. M. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **1981**, 45, 783-794.
- Seifert, W. K.; Moldowan, J. M.; Smith, G. W.; Whitehead, E. V. *Nature*. **1978**, 271,436-437.
- Sette, L.D.; Simioni, K.C.M.; Vasconcellos, S.P.; Dussan, L.J.; Neto, E.V; Oliveira, V.M. *Antoine van Leewenhoek*. **2005**, 91, 253-266.
- Shen, C. F.; Guiot, S. R. *Biotechnology and Biiengineering*. **1996**, 49, 611-620.
- Shilov, A. E.; Shul'pin, G. B. *Chemical Review*. **1997**, 97, 2879-2932.
- Sicard, R.; Chen, L. S.; Marsaioli, A. J.; Reymons, J-L. *Advanced Synthesis & Catalysis*. **2005**, 347(7-8), 1041-1050.

- Simoneit, B. R. T.; Lein, A. Y. G. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **2004**, 68(10), 2275-2294.
- Simons, D-J. H.; Kenig, F. *Organic Geochemistry*. **2003**, 34, 1177-1198.
- Singh, A.; van Hamme, J. D.; Ward, O. P. *Biotechnology Advances*. **2007**, 25, 99-121.
- Smits, T. H.; Balada, S. B.; Witholt, B.; van Beilen, J. B. *Journal Bacteriology*. **2002**, 184, 1733-1742.
- So, C. M.; Phelps, C. D.; Young, L. Y. *Applied and Environmental Microbiology*. **2003**, 69, 3892-3900.
- Sonibare, O. O. ; Ekweozor, C. M. *Journal of Applied Sciences*. **2004**, 4(3), 508-512.
- Steiger, R. P.; Leung, P. K. *Society of Petroleum Engineers*. **1992**, paper 18024, 181-185.
- Steller, S. ; Valter, J. ; *Journal Chromatography B*. **2000**, 737, 267.
- Thauer, R.K.; Jungermann, K.; Decker, K. *Bacteriological Reviews*. **1977**, 41, 100-180.
- Thomas, J. D.; Triggia, A. A.; et. al. *Fundamentos de Engenharia do Petróleo*. **2001**, Ed. Interciência, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Tissot, B. P. and Welte, D. H. *Petroleum Formation and Occurrence*. **1978**, 2nd Ed. Springer-Verlag. Berlim Heidelberg New York.
- Tissot, B.P. e Welte, D.H. *Petroleum Formation and Occurrence*. **1984**, Springer-Verlag. Berlim Heidelberg New York.
- Toledo, L. G.; Calvo, C.; Rodelas, B.; González-López, J. *Journal System and Applied Microbiology*. **2006**, 29 (3), 244-252.
- Treadway, S. L.; Yanagimachi, K. S.; Lanckenau, E.; Lessard, P. A.; Stephanopoulos, G.; Sinskey, A. J. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **1999**, 51, 786-793.
- Trendel, J. M.; Restlé, A.; Connan, J.; Albrech, P. *Journal Chemical Society, Chemical Communication*. **1982**, 304-306.

Trindade, L. A. F. Dissertation for the degree of Doctor of Philodophy, Stanford University, **1992**.

Trindade, L. A. F.; Dias, J. L.; Mello, M. R. In: B. J. Katz (Ed.), Petroleum Source Rocks. *Casebooks in Earth Sciences*, Springer-Verlag, **1995**, p. 149-166.

van Hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. *Microbiology Molecular Biology Review*. **2003**, 67 (4), 503-549.

Vasconcellos, S. P. Tese de Doutorado. Instituto de Química/UNICAMP, **2005**.

Vazoller, R. F. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, USP, **1995**.

Volkman, J. K.; Alexander, R.; Kagi, R. I.; Rowland, S. F.; Sheppard, P. N. *Organic Geochemistry*. **1984**, 6, 619-632.

Volkman, J. K.; Alexander, R.; Kagi, R. I.; Woodhouse, G. W. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **1983b**, 47, 785-794.

Voordouw, G. et al. *Applied and Environmental Microbiology*. **1996**, 62, 1623-1629.

Wahler, D.; Reymond, J-L. *Current Opinnion Chemical Biology*. **2001**, 5, 152-158.

Walker, J. D.; Cowell, R. R. *Applied and Environmental Microbiology*. **1976**, 31, 198-207.

Walton, A. Z.; Stewart, J. D. *Biotechnology Progress*. **2002**, 18, 262-268.

Wang, Z.; Fingas, M. F.; Sigouin, L.; Owens, E. H. *Process International Oil Spill Conference*. **2001**, 115-125.

Weijers, C. A. G. M.; de Bont, J. A. M. *Journal Molecular Catalysis B-Enzyme*. **1998**, 5, 79-83.

Wentzel, A.; Ellingsen, T. E.; Kotlar, H-K.; Zotchev, S. B.; Throne-Holst, M. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2007**, 76, 1209-1221.

Weston, R. J.; Philp, R. P.; Sheppard, C. M.; Woolhouse, A. D. *Organic Geochemistry*. **1989**, 14, 405-421.

- Widdel, F.; Rabus, R. *Current Opinion Biotechnology*. **2001**, 12, 259-276.
- Wilkes, H.; Rabus, R.; Fischer, T.; Armstroff, A.; Behrends, A.; Widdel, F. *Archives microbiology*. **2002**, 177, 235-243.
- Williams, J. A.; Bjoroy, M.; Dolcater, D. L.; Winters, J. C. *Organic Geochemistry*. **1986**, 10, 451-461.
- Xu, J.; Trimble, J. J.; Steinberg, L.; Logan, B. E. *Water Research*. **2004**, 38, 673-680.
- Yumoto, I.; Nakamura, A.; Iwata, H.; Kojima, K.; Kusumoto, K.; Nodasaka, Y.; Matsuyama, H. *Int Journal Syst Evol Microbiology*. **2002**, 52, 85-90.
- Yuste, L.; Corbella, M. E.; Turiegano, M. J.; Karlson, U.; Puyet, A.; Rojo, F. *FEMS Microbiology Ecology*. **2000**, 32, 69-75.
- Zajic, J. E.; Seffens, W. *Critical Review Biotechnology*. **1984**, 1, 87.
- Zarilla, K. A.; Perry, J. J. *Archives Microbiology*. **1984**, 137, 286-290.
- Zengler, K.; Heider, J.; Roselló-Mora, R.; Widdel, F. *Archives Microbiology*. **1999**, 172, 204-212.
- Zhang, D.; Huang, D.; Li, J. *Organic Geochemistry*. **1988**, 13, 295-302.
- Zhou, Q. H.; Kosaric, N. *Journal American Oil Chemistry Society*. **1995**, 72, 67-71.
- Zhusheng, J.; Fowler, M. G.; Lewis, C. A.; Philp, R. P. *Organic geochemistry*. **1990**, 15, 33.
- Zinder, S. H.; Cardwell, S. C.; Anguish, T.; Lee, M.; Koch, M. *Applied and Environmental Microbiology*. **1984**, 47, 27-33.