
Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica



Dissertação de Mestrado

**“ESTUDO DA MICROBIOTA E DA BIODEGRADAÇÃO DE
PETRÓLEO DE BACIAS BRASILEIRAS, E SUA
IMPLICAÇÃO NOS PARÂMETROS DE
BIODEGRADAÇÃO”**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Campinas, como parte das exigências do programa de pós-graduação do Instituto de Química, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Célio Fernando Figueiredo Angolini

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

19 de fevereiro de 2009

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

An47e	<p>Angolini, Célio Fernando Figueiredo. Estudo da microbiota e da biodegradação de petróleo de bacias brasileiras, e sua implicação nos parâmetros de biodegradação / Célio Fernando Figueiredo Angolini. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.</p> <p style="text-align: center;">Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.</p> <p style="text-align: center;">Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p style="text-align: center;">I. Petróleo. 2. Biodegradação. 3. Atividade enzimática. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

Título em inglês: Study of the microbiota and of petroleum biodegradation in Brazilian basins, and its consequences on the biodegradation parameters

Palavras-chaves em inglês: Petroleum, Biodegradation, Enzymatic activity

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (orientadora), Dr. Eugênio Vaz dos Santos Neto (CENPES-Petrobrás-RJ), Profa. Dra. Luzia Koike (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 19/02/2010



“A leitura após certa idade distrai excessivamente o espírito humano das suas reflexões criadoras. Todo o homem que lê demais e usa o cérebro de menos adquire a preguiça de pensar.”

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

“Uma pessoa que nunca cometeu um erro é uma pessoa que nunca tentou algo de novo”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Criador, pela dádiva desse universo de infinitas possibilidades que é a vida. Aos meus pais Mary Stela e Sérgio Angolini e a alguns familiares pelo amor, apoio (principalmente o financeiro) nessa etapa de minha vida.

Aos meus avôs Fernando e Edelzita Figueiredo e Célio e Luzita Angolini, pelo nome e pelos muitos momentos de alegria e tristeza que contribuíram à formação de meu caráter.

A professora Anita pela oportunidade, ensinamentos e confiança que, sem sombra de dúvidas, foram essenciais à minha formação e na conclusão desse trabalho.

A todos os meus professores do colégio (Villa, Deschen, Sandra, Maria Amália, Valéria, Chico e outros tantos), da graduação (Luis, Pilli, Herrera, Italo, Regina e etc.), da pós (Reis, Luzia e Valéria) que contribuíram e contribuem para o meu aprendizado.

Aos meus amigos Fanny, Renan, Carol e Ana Luisa meus companheiros desde a época de colégio (bons tempos aqueles); Francisco, Luis, Elisa, Luciene, Caroline, Letícia, Natalia, Alexandre, Tiago e Ramon companheiros de relatórios à mão, listas e mais listas de exercícios, piqueniques pela Unicamp e tudo o mais. Aos meus amigos “QAdores” pela amizade, o “Twix Day” e é claro o Wii do Marcelo. Aos amigos do laboratório Georgiana, Simone, Luciana, Adriana, Cabeça, Lucas, Bruna, Arnaldo, Suzan, André, Cíntia, Humberto, Carla, Duda, Armando e Pedrão pela amizade e momentos de diversão. Aos amigos João, Rafael e Rafa do laboratório vizinho onde me refúgio às vezes.

A Dona Maria que sempre nos ajudou no laboratório e nos trata com muito carinho e respeito. E aos técnicos e funcionários das oficinas do instituto que sempre me atenderam e foram essenciais a manutenção do laboratório.

A Bel, Isabel e Miguel da CPG que tanto nos ajudam com a burocracia e estão sempre dispostos a nos atender.

A Petrobrás pelo suporte financeiro. E a Capes e CNPQ pelas bolsas durante meu mestrado.

Finalmente a todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

CURRICULUM VITAE

Nome: Célio Fernando Figueiredo Angolini

Endereço Eletrônico: celio.fernando@gmail.com ou cangolini@iqm.unicamp.br

Currículo na Plataforma Lattes:

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=K4231856D9>

1. FORMAÇÃO E TÍTULOS ACADÊMICOS

2008 – 2010 **Mestrado em Química Orgânica** – Universidade Estadual de Campinas, SP.

Área de Concentração: Química Orgânica.

Título da Tese: “*Estudo da microbiota e da biodegradação de petróleo de bacias brasileiras, e suas implicações nos parâmetros de biodegradação*”

2004 – 2008 **Bacharelado em Química** – Universidade Estadual de Campinas, SP.

Iniciação Científica: “*Determinação da configuração absoluta de epóxidos pelo princípio de Horeau*” (2006-2007), “*Síntese e desracemização de derivados do 1,2,4-butanotriol, por biotransformação*” (2007-2008).

2. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Programa de Estágio a Docência (IQ/Unicamp) – PED C

Disciplina: Química Orgânica Experimental (Farmácia)

Período: 1º Semestre 2009

Programa Ciência & Arte nas Férias 2009

Função: Monitor **Projeto:** “*Utilização de enzimas de origem vegetal ou microbiana na realização de reações de biotransformação*”

Período: 09/01 – 06/02

Empresa Júnior: AllQuímica Consultoria Júnior

Função: Assessor de Marketing (2004) e Projetos (2005), Diretor Presidente (2006), Administrativo-Financeiro (2008) e Conselho (2009).

Período: 2004-2009

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Trabalhos Resumidos em Eventos

ANGOLINI, C. F. F.; Mantovani, S. M.; Oliveira de, L. G.; Marsaioli, A. J. **Síntese e desracemização do 1,2,4-butanotriol por biocatálise.** 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; Marsaioli, A. J. **Síntese, desracemização e biotransformação com derivados do 1,2,4-butanotriol.** XV Congresso interno de iniciação científica, 2007, Campinas, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; Mantovani, S. M.; Oliveira de, L. G.; Marsaioli, A. J. **1,2,4-butanetriol deracemization using whole cells of *Candida albicans* CCT0776**. 12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, **2007**, Itapema, SC.

ANGOLINI, C. F. F.; Mantovani, S. M.; Oliveira de, L. G.; Marsaioli, A. J. **Biotransformação de derivados do 1,2,4-butanotriol**. 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2008**, Águas de Lindóia, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; Marsaioli, A. J. **Biotransformação de derivados do 1,2,4-butanotriol**. XVI Congresso interno de iniciação científica, **2008**, Campinas, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; da Cruz, G. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. **Análise da biodegradação aeróbia de petróleo do Campo Pampo Sul, Bacia de Campos**. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2009**, Fortaleza, CE.

ANGOLINI, C. F. F.; da Cruz, G. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. **Utilização de microbiota indígena na biodegradação aeróbia de petróleo**. III Workshop de Biodegradação & Biorremediação, **2009**, Campinas, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; da Cruz, G. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. **Characterization of biosurfactants produced by petroleum microbial consortia**. 3º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, **2009**, Campinas, SP.

3.2 Artigos completos publicados

Mantovani, S. M.; ANGOLINI, C. F. F.; Marsaioli, A. J. **“Mechanistic investigation of *Candida albicans* CCT 0776 stereoinversion system and application to obtain enantiopure secondary alcohols”**, *Tetrahedron: Asymmetry*.**2009**, 20, 2635-2638.

3.2 Artigos submetidos para periódicos

Cruz, G. F.; ANGOLINI, C. F. F.; Santos Neto, E. V.; Loh, W. Marsaioli, A. J. **“Biosurfactants Produced by Petroleum Microbial Consortia of Brazilian Reservoirs.”**, Submetido para *J. Braz. Chem. Soc.* em **2009**

Cruz G. F., ANGOLINI C. F. F., Oliveira L. G., Lopes P. F., Vasconcellos S. P., Crespim E., Oliveira, V. M., Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. **Searching for monooxygenases and hydrolases in bacteria from an extreme environment**. Submetido para *Applied Microbiology and biotechnology* em **2009**.

RESUMO

“Estudo da microbiota e da biodegradação de petróleo de bacias brasileiras, e suas implicações nos parâmetros de biodegradação”

Mestrando: Célio Fernando Figueiredo Angolini

Orientadora: Prof. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Palavras-chave: Petróleo, biodegradação, parâmetros de correlação, atividade enzimática.

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a biodegradação de petróleo e suas implicações nos parâmetros de correlação do óleo realizada por microrganismos isolados da Bacia de Campos (RJ) e de consórcios microbianos da Bacia Potiguar (RN). Os experimentos de biodegradação foram adaptados à escala laboratorial, a fim de mimetizar um reservatório de petróleo. O estudo das atividades enzimáticas com moléculas representantes de algumas classes de biomarcadores de petróleo revelou a existência de enzimas capazes de realizar algumas reações como as de: lipase, esterase, epóxido-hidrolase, mono e dioxidases, redutases e liases (reações de formação e/ou rompimento de ligações carbono-carbono). Atividades essas importantes na degradação do petróleo e de outras fontes de carbono. Nos experimentos com biodegradação de petróleo pôde-se perceber que os microrganismos isolados atuaram de forma diferente entre si sobre as diferentes classes de biomarcadores. De maneira geral a biodegradação dos microrganismos isolados com o óleo P1 apresentou uma preferência na seguinte ordem: hidrocarbonetos saturados > aromáticos leves > bicíclicos > terpanos tricíclicos e hopanos. Já para o consorcio avaliado, recuperado do óleo da bacia Potiguar, frente ao óleo PS1 observou-se a seguinte seqüência de biodegradação: hidrocarbonetos leves> aromáticos leves> terpanos tricíclicos. Sendo que os hidrocarbonetos mais pesados e hopanos não apresentaram uma biodegradação tão significativa. Os resultados obtidos foram importantes para concluir que alguns dos parâmetros de biodegradação utilizados em geoquímica orgânica variam muito em função do tipo de atuação da microbiota específica presente no reservatório.

Abstract

“Study of the microbiota and of petroleum biodegradation in Brazilian basins, and its consequences on the biodegradation parameters.”

Student: Célio Fernando Figueiredo Angolini

Advisor: Prof Dr Anita Jocelyne Marsaioli

Keywords: Petroleum, Biodegradation, Enzymatic activity, Biodegradation parameters.

The main objective of this study was to evaluate the oil biodegradation of the Pampo Sul oil field (Campos Basin , RJ) isolated microorganisms and the Potiguar Basin (RN) microbial consortia and how they affected the geochemical parameters. The biodegradation experiments of selected molecules, chosen to represent some petroleum biomarker classes, were adapted to the laboratory scale trying to mimic an oil reservoir, revealed the presence of lipases, esterases, epoxide hydrolases, mono and dioxygenases, reductases and some C-C bond cleaving and bond making (liases) enzymes. These activities are important for oil degradation and of other carbon sources. In experiments of oil biodegradation these microorganisms had a different behaviour upon each biomarker class. In general the biodegradation of microorganisms with the oil P1 showed a preference for: hydrocarbons > light aromatic > bicyclic terpanes > tricyclic terpanes and hopanes. Microorganisms from Potiguar Basin oil had a different preference in biodegradation: light hydrocarbons> light aromatic > tricyclic terpanea, and the heavier hydrocarbons and hopanes showed no significant biodegradation. In conclusion, these results reveal that the geochemical parameters that are proxies of biodegradation depend on the specific microbiota in the reservoir.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina do soro bovino
HCO	Hidrocarbonetos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAr	DNA ribossomal
HTS	<i>High Throughput Screening</i> – Triagem enzimática de alto desempenho
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas
eV	Elétrons Volt
<i>m/z</i>	Razão entre a massa do fragmento e a sua carga
IV	Infravermelho
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i>
RIC	<i>Reconstructed Ion Chromatogram</i>
IR	Índice de retenção
IPC	Índice de preferência de carbono
Pr	Pristano
Ft	Fitano
AC	Alquilcicloexano
BC	Alquilbenzeno
MC	metil-Alquilbenzeno
TB	trimetil-Alquilbenzeno
AN	Alquilnaftênicos
TriMN	trimetil-Naftênicos
TeMN	tetrametil-Naftênicos

F	Fenantreno
MF	metil-Fenantreno
DMF	dimetil-Fenantreno
TT	Terpano tricíclico
H	Hopanos
PI	Padrão interno
FN	Fração Neutra

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características geoquímicas das amostras utilizadas no presente estudo.....	18
Tabela 2 – Atividades enzimáticas (hidrolases) em bactérias isoladas do Co2 (% de conversão)*. ²⁵	21
Tabela 3 – Atividades enzimáticas (hidrolases) em bactérias isoladas do CON1 (% de conversão)*.	22
Tabela 4 – Rendimento de hidrólise de 9 e 11 após 96 h de reação.	24
Tabela 5 – Biomarcadores monitorados e seus respectivos íons-fragmentos característicos.	40
Tabela 6 – Parâmetros de biodegradação para os ensaios com microrganismos isolados.....	45
Tabela 7 – Análise dos alquilcicloexanos através do RIC <i>m/z</i> 82.	46
Tabela 8 – Análise dos alquilbenzenos através do RIC <i>m/z</i> 92.	49
Tabela 9 – Análise dos metil-alkilbenzenos através do RIC <i>m/z</i> 105.....	50
Tabela 10 – Análise dos trimetil-alkilbenzenos através do RIC <i>m/z</i> 133.	52
Tabela 11 – Análise dos alquilnaftênicos através do RIC <i>m/z</i> 141.....	53
Tabela 12 – Índice MPI – 1 das amostras de petróleo após processo de biodegradação.....	58
Tabela 13 – Índice DMP das amostras de petróleo após processo de biodegradação.....	59
Tabela 14 – Análise dos sesquiterpenos bicíclicos através do RIC <i>m/z</i> 123. .	62
Tabela 15 – Análise dos terpanos tricíclicos e tetracíclicos através do RIC <i>m/z</i> 191.	65
Tabela 16 – Análise dos terpanos pentacíclicos através do RIC <i>m/z</i> 191.....	66
Tabela 17 – Parâmetros de correlação da classe dos terpanos calculados para os ensaios de biodegradação.	68
Tabela 18 – Parâmetros de biodegradação para os ensaios com o CON1.....	71
Tabela 19 – Parâmetros de correlação da classe do <i>m/z</i> 191 para os ensaios com o CON1.....	75
Tabela 20 – Características geoquímicas das amostras de óleo utilizadas para obtenção dos consórcios e microrganismos isolados.....	84
Tabela 21 – Solução Tampão ácido bórico-bórax.....	89
Tabela 22 – Massas obtidas das frações para todos os experimentos.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução da matéria orgânica durante e após sedimentação. A escala de profundidade pode variar dependendo do gradiente geotérmico e do tipo da matéria orgânica. (adaptado de Peters <i>et al.</i>) ⁴	3
Figura 2 – Substratos utilizados nas multibioreações, cujos esqueletos são representantes de algumas classes de compostos presentes no petróleo.	25
Figura 3 – Cromatograma da amostra controle dos ensaios de multibioreação com classes de compostos presentes no petróleo.....	26
Figura 4 – Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualeno (15), ác. Nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18).	27
Figura 5 – Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualeno (15), ác. Nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18).	29
Figura 6 – Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 21 dias de reação com o microrganismo CFA 03 utilizando esqualeno (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17).....	30
Figura 7 – Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 28 dias de reação com o microrganismo CFA 03 utilizando esqualeno (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17).....	31
Figura 8 – Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 21 dias de reação com o microrganismo CFA 06 utilizando esqualeno (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10-diidrofenantreno (18).....	32
Figura 9 – Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 14 dias de reação com o microrganismo CFA 20 utilizando esqualeno (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17).....	33
Figura 10 – Intermediários de degradação do ácido nonadecanóico obtidos através do CG/EM do ensaio com o microrganismo CFA 20, após 14 dias de reação.....	34
Figura 11 – RIC m/z 71 obtido da análise por CG/EM da fração F1 da amostra controle – 30 dias.....	41
Figura 12 – Nível de biodegradação em amostras de óleos.(Adaptado de Peter & Moldowan) ¹¹ 1. Depleção de <i>n</i> -alcanos de baixo peso molecular; 2. Degradação das <i>n</i> -parafinas; 3. Traço das parafinas <i>n</i> -lineares; 4. Ausência das parafinas, isoprenóides acíclicos ainda intactos; 5. Isoprenóides acíclicos ausentes; 6. Esteranos parcialmente degradados; 7. Esteranos degradados e diasteranos intactos; 8. Hopanos parcialmente degradados; 9. Hopanos ausentes, diasteranos degradados; 10. Esteranos C ₂₆ – C ₂₉ aromáticos atacado.	41

Figura 13 – RIC m/z 71 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 biotransformado por: a) <i>Bacillus pumilus</i> (SG10) 30 dias b) <i>Bacillus pumilus</i> (SG10) 60 dias.....	43
Figura 14 – RIC m/z 71 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 biotransformado por <i>Bacillus pumilus</i> (SG12) 60 dias.....	44
Figura 15 – RIC m/z 82 obtido da análise por CG/EM da fração F1 da amostra controle.	46
Figura 16 – Espectro de massas do <i>n</i> -nonilcicloexano representante da série homóloga alquilcicloexanos.....	46
Figura 17 – RIC m/z 83 (<i>n</i> -alquilcicloexanos + <i>n</i> -alcanos) obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1: a) não biodegradado; b) biodegradado por <i>Bacillus pumilus</i> (SG42-1) 30 dias e c) biodegradado por <i>Bacillus pumilus</i> (SG42-1) 60 dias.	47
Figura 18 – RIC m/z 92 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.	49
Figura 19 – Espectro de massas do <i>n</i> -nonilbenzeno representante da série homóloga dos alquilbenzenos.	49
Figura 20 – RIC m/z 105 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.	50
Figura 21 – Espectro de massas do metil-nonilbenzeno representante da série homóloga dos metil-alquilbenzenos.....	50
Figura 22 – RIC m/z 133 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.	51
Figura 23 – Espectro de massas do 1-heptil-2,3,6-trimetilbenzeno representante da série homóloga dos trimetil-alquilbenzenos.	52
Figura 24 – RIC m/z 141 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.	53
Figura 25 – Espectro de massas do 1-naftil-undecano representante da série homóloga dos alquilnaftênicos.....	54
Figura 26 – RIC m/z 141 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1: a) biodegradado por <i>Bacillus pumilus</i> (SG29) 30 dias e b) biodegradado por <i>Bacillus pumilus</i> (SG29) 60 dias.	54
Figura 27 – RIC m/z 155 (trimetilnaftênicos) + m/z 184 (tetrametilnaftênicos) obtido da análise por CG/EM da fração F1 da amostra controle.....	55
Figura 28 – RIC m/z 155 (trimetilnaftênicos) + m/z 184 (tetrametilnaftênicos) obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1: a) biodegradado por <i>Bacillus pumilus</i> (SG13) 30 dias e b) biodegradado por <i>Bacillus pumilus</i> (SG13) 60 dias.....	55
Figura 29 – Representação esquemática dos metil-fenantrenos mais encontrados em amostras de petróleo.	57

Figura 30 – RIC m/z 178 (F) + m/z 192 (MFs) obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.	57
Figura 31 – Correlação entre o índice MPI – 1 com os estágios da geração do petróleo. Adaptado de Killops e Killops. ⁵⁵	58
Figura 32 – RIC m/z 191 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.	59
Figura 33 – RIC m/z 191 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1: a) Controle não biodegradado; b) biodegradado por <i>Bacillus pumilus</i> (SG 13) – 30 dias; c) biodegradado por <i>Bacillus pumilus</i> (SG13) – 60 dias.	60
Figura 34 – RIC m/z 123 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.	61
Figura 35 – Espectro de massas do sesquiterpano bicíclico 8 β (H)-homodrimano.	62
Figura 36 – Acompanhamento da concentração do 8 β (H) – homodrimano nos ensaios de biodegradação.	63
Figura 37 – Terpano tricíclico, formado anaerobicamente a partir da ciclização do hexaprenol.	63
Figura 38 – RIC m/z 191 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 da amostra controle (Terpanos Tricíclicos).	64
Figura 39 – Espectro de massas do terpano tricíclico C ₂₃ , representante da classe dos terpanos tricíclicos.	65
Figura 40 – RIC m/z 191 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle (Homohopanos).	65
Figura 41 – Espectro de massas do 17 α ,21 β -30-hopano, representante da classe dos terpanos pentacíclicos.	66
Figura 42 – Índice homohopano calculado para os ensaios de biodegradação.	67
Figura 43 – RIC m/z 71 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo PS1 biodegradadas pelo consórcio microbiano CON1. a) 10 dias; b) 30 dias e c) 60 dias.	70
Figura 44 – RIC m/z 83 (<i>n</i> -Alquilcicloexanos + <i>n</i> -alcanos) obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo PS 1 biodegradadas pelo consórcio microbiano CON1. a) 10 dias; b) 30 dias; c) 60 dias.	72
Figura 45 – RIC m/z z 178 (F) + m/z 192 (MFs) obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo PS 1 biodegradadas pelo consórcio microbiano CON1. a) 10 dias; b) 60 dias.	73
Figura 46 – SIM m/z 191 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo PS1 biodegradadas pelo consórcio microbiano CON1. a) 10 dias; b) 30 dias e c) 60 dias.	74

Figura 47 - Espectro de massas do composto 19 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	99
Figura 48 – Espectro de massas do composto 20 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	100
Figura 49 – Espectro de massas do composto 21 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	101
Figura 50 – Espectro de massas do composto 22 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	102
Figura 51 – Espectro de massas do composto 23 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	103
Figura 52 – Espectro de massas do composto 24 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	104
Figura 53 – Espectro de massas do composto 25 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	105
Figura 54 – Espectro de massas do composto 26 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	106
Figura 55 – Espectro de massas do composto 28 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	107
Figura 56 – Espectro de massas do composto 29 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	108

Figura 57 – Espectro de massas do composto 30 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	109
Figura 58 – Espectro de massas do composto 30 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18) como substratos.	110
Figura 59 – Espectro de massas do composto 32 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 28 dias de reação com a bactéria CFA 03 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17) como substratos.	111
Figura 60 – Espectro de massas do composto 33 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 28 dias de reação com a bactéria CFA 03 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17) como substrato.	112
Figura 61 – Espectro de massas do composto 34 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 21 dias de reação com a bactéria CFA 06 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10-diidrofenantreno (18) como substrato.	113
Figura 62 – Espectro de massas do composto 35 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 21 dias de reação com a bactéria CFA 06 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10-diidrofenantreno (18) como substrato.	114
Figura 63 – Espectro de massas do composto 36 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 21 dias de reação com a bactéria CFA 06 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10-diidrofenantreno (18) como substrato.	115
Figura 64 – Espectro de massas do composto 37 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17) como substrato.	116
Figura 65 – Espectro de massas do composto 38 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17) como substrato.	117
Figura 66 – Espectro de massas do composto 39 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17) como substrato.	118

Figura 67 – Espectro de massas do composto 40 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17) como substrato.	119
Figura 68 – Espectro de massas do composto 41 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17) como substrato.	120
Figura 69 – Espectro de massas do composto 42 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17) como substrato.	121
Figura 70 – Espectro de massas do composto 43 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17) como substrato.	122
Figura 71 – Espectro de massas do composto 44 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17) como substrato.	123
Figura 72 – Espectro de massas do composto 45 obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (15), ác. nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e fenantreno (17) como substrato.	124

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Rota de biodegradação aeróbia de alcanos.(adaptado de Wentzel <i>et al.</i>).....	9
Esquema 2 – Rota de biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos (adaptado de Fritsche <i>et al.</i>)	10
Esquema 3 – Reações envolvidas no processo de triagem para as sondas de lipase(5), esterase (3 , 4) e epóxido hidrolase (1 e 2).....	20
Esquema 4 – Reação de hidrólise de 9 e 11.....	23
Esquema 5 – Rota de degradação proposta para o 9,10-diidrofenantreno para o microrganismo CFA21.....	28
Esquema 6 – Intermediários da degradação da 4-colesten-3-nona obtido através do CG/EM do ensaio com o microrganismo CFA 21.	29
Esquema 7 – Intermediários de degradação do fenantreno obtidos através do CG/EM do ensaio com o microrganismo CFA 03.....	31
Esquema 8 – Intermediários de degradação da 4-colesten-3-nona obtidos através do CG/EM do ensaio com o microrganismo CFA 06, após 21 dias de reação.....	32

ÍNDICE

1	Introdução.....	1
1.1	Biodegradação	5
1.1.1	Condições necessárias a biodegradação.....	7
1.1.2	Metabolismo.....	8
1.1.3	Triagem de alto desempenho	10
2	Objetivos	12
	Capítulo I	15
1	Resultados e Discussões.....	17
1.1	Obtenção e identificação dos microrganismos	17
1.2	Triagem de alto desempenho.....	18
1.3	Biotransformação com substratos não fluorogênicos.....	23
1.3.1	Substratos de interesse sintético.....	23
1.3.2	Classe de substratos presentes no petróleo	24
2	Conclusão	35
	Capítulo II.....	37
1	Resultados e Discussões.....	39
1.1	Microrganismos isolados do Campo Pampo Sul, Bacia de Campos ..	39
1.1.1	<i>n</i> -Alcanos e isoprenóides	42
1.1.2	<i>n</i> -Alquilcicloexanos	45
1.1.3	Aromáticos leves.....	48
1.1.3.1	Alquil, metil-alquil, e trimetil-alquilbenzenos.....	48
1.1.3.2	Alquilnaftênicos, trimetil e tetrametilnaftênicos.....	52
1.1.3.3	Fenantrenos, metil e dimetilfenantrenos.....	56
1.1.4	Terpanos.....	61
1.1.4.1	Sesquiterpanos Bicíclicos.....	61
1.1.4.2	Terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos.....	63
1.2	Consórcios microbianos recuperados do Campo Pintassilgo, Bacia Potiguar	69
1.2.1	<i>n</i> -Alcanos e isoprenóides	69
1.2.2	<i>n</i> -Alquilcicloexanos	71

1.2.3	Fenantrenos, metil e dimetilfenantrenos	72
1.2.4	Terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos	73
2	Conclusão	76
	Parte experimental.....	79
1	Equipamentos e condições empregadas	81
1.1	Solventes, reagentes e meios de cultura	81
1.2	Cromatografia em camada delgada (CCD)	81
1.3	Cromatografia em coluna (CC)	82
1.4	Espectrometria de fluorescência.....	82
1.5	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	83
2	Amostras estudadas	83
3	Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise	85
4	Preparo de soluções e meios minerais.....	85
5	Enriquecimento para obtenção dos microrganismos	86
5.1	Obtenção dos consórcios aeróbios.....	87
5.2	Obtenção dos microrganismos isolados	87
6	Ensaio enzimáticos de alto desempenho (HTS)	88
6.1	Prepara da solução tampão borato	89
6.2	Preparo de soluções	89
6.2.1	Sondas fluorogênicas	89
6.2.2	Periodato de sódio	89
6.2.3	Solução de BSA	90
7	Ensaio de biodegradação	90
7.1	Ensaio de biotransformação convencionais (multibioreações).....	90
7.2	Biodegradação de petróleo com microrganismos isolados	91
7.3	Tratamento estatístico dos óleos.....	92
7.3.1	Obtenção da frações neutras	92
7.4	Métodos de Análise	96
7.4.1	Cromatografia e espectrometria de massas	96
8	Apêndice I	99

1 Introdução

No passado a origem do petróleo foi um assunto polêmico, alguns como Dmitri Mendeleev ¹ defendiam a hipótese de sua origem ser estritamente inorgânica, a partir de carburetos que decompostos pela ação da água (hidrólise) que dariam origem a hidrocarbonetos menores, e pela pressão sofreriam polimerização originando enfim o petróleo. Hoje já se sabe que o petróleo, encontrados em quantidades comerciais, é de origem orgânica e suas características estão diretamente ligadas às condições ambientais, à época da deposição da matéria orgânica, a sua evolução térmica e ao seu nível de biodegradação.

Para sua formação inicialmente é necessário que a matéria orgânica se deposite em ambientes anóxicos, uma vez que em ambientes ricos em oxigênio a biodegradação da matéria orgânica é total, levando a mineralização da mesma formando CO₂ e H₂O. ² No processo de sedimentação da matéria orgânica e do sedimento que ocorre lentamente, inicia-se a transformação da matéria orgânica, e a atividade microbiana (aeróbia e anaeróbia) é intensificada, grupos funcionais começam a ser eliminados e as ligações com heteroátomos começam a ser quebradas. Também há a matriz mineral, rica em centros catalíticos, que ativa as reações físico-químicas (hidrólise, desidratação e desaminação).

No primeiro estágio evolutivo, *diagênese*, a matéria orgânica (biopolímero) que é constituído pelos “restos” animais e vegetais é convertido em um geopolímero (querogênio) através de alterações químicas, biológicas ou físicas que ocorrem a temperaturas relativamente baixas (T < 50 °C). Sua

¹ Kolesnikov, A.; Kutcherov, V. G.; Goncharov, A. F.; *Nature geoscience*. **2009** (2), 566-570.

² Tissot, B.P., Welte, D.H.; *Petroleum Formation and Occurrence – A New Approach to Oil and Gas Exploration*, 2th ed., Springer, New York, **1978**.

composição é controlada durante a sedimentação principalmente pelas características da matéria orgânica dos organismos precursores e pela natureza e extensão dessas atividades incluindo as microbianas,² nesta fase o metano é o único hidrocarboneto com geração significativa. No segundo estágio evolutivo, *catagênese*, ocorrem processos termoquímicos (~50-150 °C) que transformam o querogênio em outras classes de substâncias orgânicas (petróleo). A qualidade e quantidade do óleo gerado dependem do tipo do querogênio e das condições de temperatura e pressão a que rocha geradora foi submetida durante a evolução geológica da bacia.

A *metagênese*, terceiro estágio evolutivo, é alcançada a grandes profundidades, onde altas pressões e temperaturas da ordem de 150-200 °C promovem o craqueamento do óleo cru e o rearranjo das moléculas aromáticas. É onde ocorre a formação de gás seco (metano), restando apenas um resíduo de carbono.^{3, 4}

³ Thomas, J. D.; Triggia, A. A.; et. al. *Fundamentos de Engenharia do Petróleo*. 2001, Ed. Interciência, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴ 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.

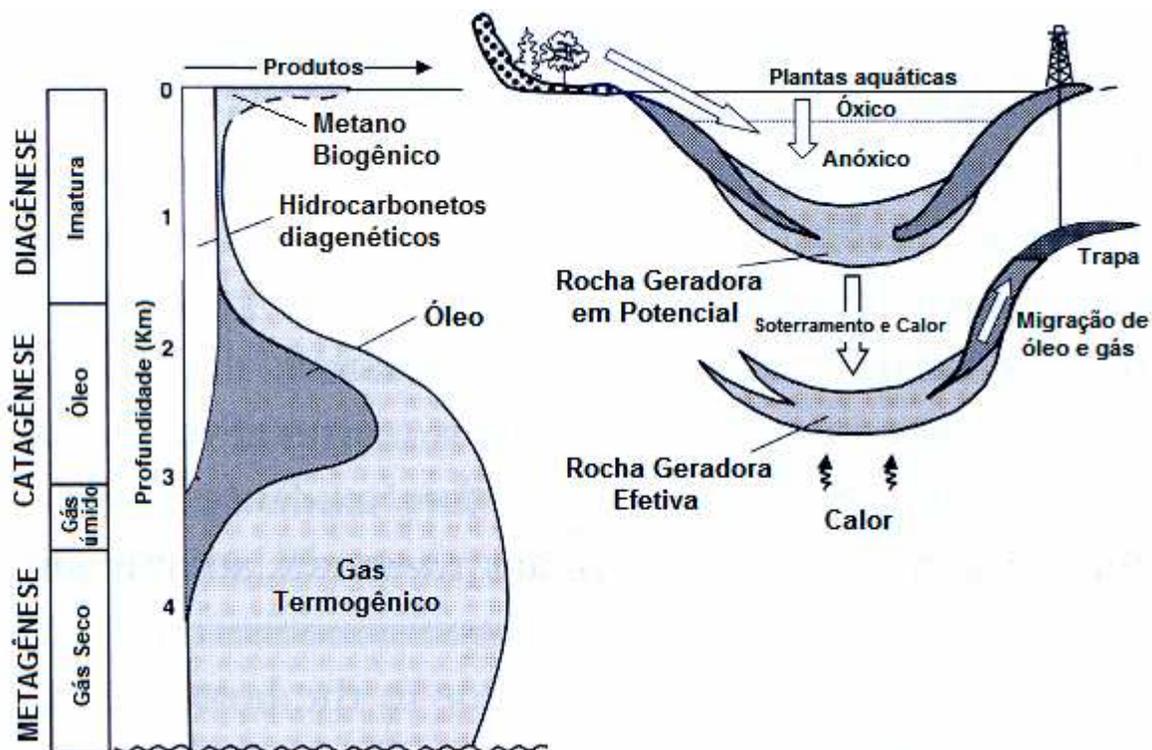


Figura 1 – Evolução da matéria orgânica durante e após sedimentação. A escala de profundidade pode variar dependendo do gradiente geotérmico e do tipo da matéria orgânica. (adaptado de Peters *et al.*)⁴

Juntamente com a matéria orgânica, outros sedimentos também são depositados dando origem à rocha geradora de petróleo. Ela deve conter um teor médio a elevado de matéria orgânica preservada com qualidade adequada para geração comercial do óleo.⁵ Por exemplo, matéria orgânica derivada de vegetais superiores tendem a gerar gás, enquanto o material derivado de zooplâncton e fitoplâncton, marinho ou lacustre, tendem a gerar óleo.²

Após sua geração, o petróleo é expulso da rocha geradora em direção a rocha reservatório (migração primária). Em seguida o óleo pode ser deslocado através de falhas e discordâncias até encontrar um reservatório capeado por uma rocha impermeável (migração secundária), ou aflora à superfície. Durante o processo de migração podem ocorrer mudanças na sua composição devido à

⁵ Milles, J. A. *Illustrate glossary of petroleum geochemistry*, Oxford Science Publications, Oxford, 1989.

geocromatografia, solubilização em água e extração de matéria orgânica presente nas rochas por onde ele passa.⁶

Sendo assim, as pesquisas sobre origem, acúmulo, migração e biodegradação de óleos são de grande importância para a exploração eficaz do petróleo e estas são auxiliadas pela análise das diversas classes de biomarcadores utilizados em geoquímica orgânica.^{7, 8, 9}

Os biomarcadores são compostos orgânicos encontrados não somente no petróleo, mas também em sedimentos e rochas, estruturalmente relacionados a produtos naturais conhecidos, presentes em plâncton, bactérias e vegetais superiores, os quais, após alterações biológicas e termoquímicas, preservam seus esqueletos carbônicos básicos.^{7, 10, 11}

Embora representem apenas uma pequena fração do petróleo são de grande importância para geoquímica orgânica. Sua composição química, a quantidade e as variações na estereoquímica de determinados compostos servem como uma “impressão digital” fornecendo informações acerca de sua origem, marinha ou lacustre,^{11, 12}; ambiente deposicional da rocha geradora ou paleoecologia;^{13, 14} estágio de evolução térmica^{15, 16, 17} e nível de biodegradação.^{13, 14}

⁶ Trindade, L. A. F. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy, Stanford University, **1992**.

⁷ Philp, F. P.; *Fossil Fuel Biomarkers: Applications and Spectra*, 1th ed., Elsevier, New York, **1985**.

⁸ Mello, M. R.; Telnaes, N.; Gaglianone, P. C.; Chicarelli, M. I.; Brassell, S. C.; Maxwell, J. R. *Organic Geochemistry*. **1988**, 13 (1-3), 31-45.

⁹ Holba, A. G.; Dzou, I. I.; Wood, G. D.; Ellis, L.; Adam, P.; Schaeffer, P.; Albrecht, P. Greene, T.; Hughes, W. B. *Organic Geochemistry*. **2003**, 34(3) 441-469.

¹⁰ Mello, M. R., Gaglianone, P.C., Brassell, S. C., Maxwell, J. R.; *Mar. and Petrol. Geol.* **1988**, 5, 205-223.

¹¹ Peters, K. E., Moldowan, J. M.; *The Biomarker Guide*, 1th ed., Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, **1993**.

¹² Brocks, J. J.; Sumons, R. E. et al., *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2003**, 67, 22, 4321-4335.

¹³ Holba, A. G.; Dzou, L. I., et al., *Organic Geochemistry*, **2004**, 34, 441-469.

¹⁴ Cmiel, S.; Fabianska, M. J.; *International Journal of Coal Geology*, **2004**, 57, 77-97.

¹⁵ Tolosa, I., Mora, S. ET al.; *Marine Pollution Bulletin*, **2004**, 48, 44-60.

¹⁶ Frysjinger, G. S.; Gaines, R. B.; *J. Sep. Sci.*, **2001**, 24, 87-96.

¹⁷ Hauser, A.; Dashti, H. et al.; *Fuel*, **1999**, 78, 1483-1488.

1.1 Biodegradação

Desde o início da produção comercial de petróleo, a indústria tem se deparado com problemas relacionados à ação de microrganismos nas diversas etapas de seu refino e beneficiamento.¹⁸ Estes são os responsáveis pela degradação do petróleo, corrosão dos equipamentos de transferência e dos tanques de estocagem.¹⁹

Esta degradação resulta da ação conjunta de consórcios de microorganismos que utilizam os vários constituintes do petróleo, hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e naftênicos, compostos contendo enxofre, oxigênio, nitrogênio e constituintes organometálicos como fonte de nutrientes e energia.²⁰ Nos reservatórios o processo de degradação ocorre a diferentes temperaturas e pressões, porém existem discussões quanto à degradação ser realizada pelos microorganismos aeróbios^{21, 22, 23} ou anaeróbios.^{24, 25, 26.}

Aqueles que acreditam na ação de microrganismos aeróbios assumem que a temperatura máxima durante o processo encontra-se em torno de 60-80°C e envolve a incursão de águas meteóricas que carregam oxigênio e nutrientes necessários a manutenção destes microrganismos dentro do reservatório. Já a outra vertente prega que a demanda de oxigênio é

¹⁸ Magot, M.; Ollivier, B.; Patel, B. K. C. *Antonie van Leewenhock*. **2000**, 77, 103-116.

¹⁹ Cord-Ruwich, R.; Kleintz, W.; Widdel, F. *Journal of Petroleum Technology*. **1987**, 1, 97-106.

²⁰ Van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O. P., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, 67 (4), 503-549.

²¹ Orphan, V. J.; Taylor, L. T.; Hafenbradl, D.; Delong, E. F. *Applied and Environmental Microbiology*. **2000**, 66, 700-711.

²² Bonch-Osmolovskaya, E. A.; Miroschnichenko, 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.

²³ Borzenkov, I. A.; Milekhina, E. I. Gotoeva, M. T.; Rozanova, E. P.; Beliaev, S. S. *Mikrobiologia*. **2006**, 75, 82-89.

²⁴ Coates J. D.; Woodward, J.; Allen, J.; Philip, P.; Lovley, D. R.; *Applied and Environmental Microbiology*. **1997**, 63, 3589-3593.

²⁵ Korda, A.; Santas, P.; Tenente, A.; Santas, R. *Applied and Environmental Microbiology*. **1997**, 48, 677-686.

²⁶ Voordouw, G. et al. *Applied and Environmental Microbiology*. **1996**, 62, 1623-1629.

insuficiente para manter os aeróbios ativos e, com isso, apenas os anaeróbios, restritos ou facultativos, seriam capazes de sobreviver em tais condições.

As pesquisas desenvolvidas pelo nosso grupo corroboram a hipótese que estes dois grupos de microrganismos biodegradam o petróleo, porém em tempos geológicos diferentes sendo que os dois processos são complementares.²⁷ Onde 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.

O problema da degradação do petróleo esta no fato que seus efeitos prejudicam o valor econômico do óleo por diminuir os teores de hidrocarbonetos saturados e o grau API (*American Petroleum Institute*), além de aumentar a densidade, o conteúdo de enxofre, a acidez e a viscosidade o que afeta diretamente a produção através da redução da velocidade de vazão e a eficiência do refino.²⁸ Por isso, a importância de estudos na área de biogeoquímica, biologia molecular e microbiologia para a determinação de espécies envolvidas e entender suas atividades e o processo de biodegradação sobre os óleos *in situ*.

Já foi visto que as rotas metabólicas de degradação podem variar dependendo da enzima envolvida ou do substrato a ser degradado, mas em se tratando de biodegradação de petróleo algumas condições são necessárias para favorecer esse processo.

²⁷ Da Cruz, G. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. *Organic Geochemistry*. **2008**, 39, 1204-1209.

²⁸ White, N.; Thompson, M.; Barwise, T. *Nature* **2003**, 426, 334-343.

1.1.1 Condições necessárias a biodegradação

Provavelmente, a maior parte do petróleo no mundo está total ou parcialmente biodegradada e este processo leva milhões de anos para ocorrer.

²⁹ Biodegradação esta que ocorreu nos reservatórios devido a alguns fatores: ⁴

- ✓ presença de aceptores de elétrons e nutrientes inorgânicos;
- ✓ porosidade e permeabilidade adequadas da rocha reservatório permitindo a difusão de nutrientes e motilidade de microorganismos;
- ✓ temperatura do reservatório abaixo de ~ 80 °C;
- ✓ salinidade da água de formação na faixa de ~ 100-150‰;
- ✓ presença de microorganismos capazes de degradar componentes do petróleo.

Com isso, para estudar os mecanismos de biodegradação do petróleo é preciso utilizar condições ideais para que o processo ocorra em curtos intervalos de tempo, quando comparados ao tempo geológico. No laboratório essas condições também precisam ser otimizadas para se obter resultados análogos aos da biodegradação natural.

Os efeitos da biodegradação na composição molecular e propriedades físicas do óleo são bem estabelecidos e afetam a qualidade do óleo, mas é de fundamental importância conhecer todos os fatores que afetam o processo de biodegradação como a presença de oxidantes, quantidade de oxigênio no meio, quantidade de óleo, propriedades fisiológicas, potencial bioquímico de microorganismos etc. ³⁰

²⁹ Head, I. M.; Jones, D. m.; Larter, S. R. *Nature*. **2003**, 426, 344-352.

³⁰ Röling, W. F. M.; Head, I. M.; Larter, S. R. *Research in Microbiology*. **2003**, 321-328.

Apesar das observações empíricas mostrarem que as temperaturas máximas para que ocorra biodegradação em reservatórios de petróleo são de aproximadamente 60-80 °C, ^{31, 12} o que é consistente com uma grande variedade de microrganismos mesofílicos, estas são mais baixas que o ótimo de temperatura para muitos microrganismos termofílicos, o que indica que também possa ocorrer biodegradação a temperaturas maiores (100-105 °C). ⁶

1.1.2 Metabolismo

Um dos fatores primordiais para ocorrer a biodegradação é a presença de aceptores de elétrons e nutrientes adequados para manter ativos os microrganismos de diferentes espécies. Os microrganismos aeróbios necessitam da presença de oxigênio molecular para seu crescimento e para converter os seus substratos (hidrocarbonetos, por exemplo) em CO₂, H₂O e biomassa. Existe ainda a possibilidade da presença de alguns microrganismos facultativos que adaptam seu metabolismo em função das condições do ambiente.

Outros nutrientes inorgânicos, como nitrogênio e fósforo são essenciais na biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios. Traços de metais, como molibdênio, cobalto e cobre são importantes em reações enzimáticas e podem limitar o processo de biodegradação do petróleo. ³²

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. ^{33, 34, 35} A etapa inicial é

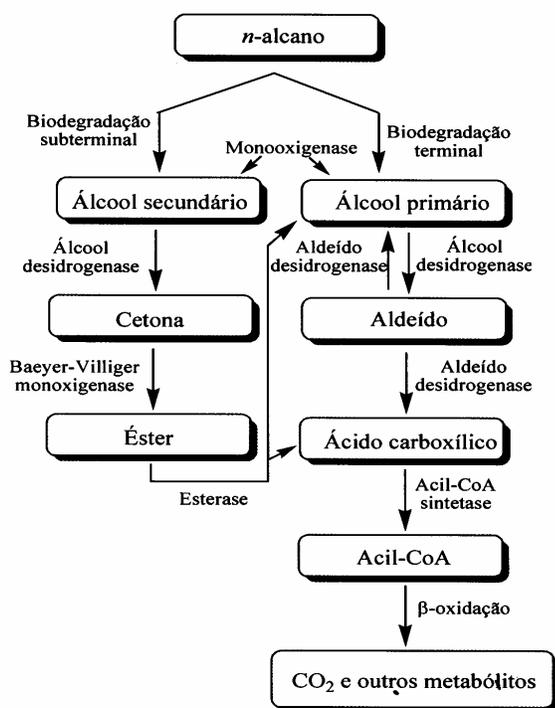
³¹ Evans, C. R.; Rogers, m. A.; Bailey, N. J. L. *Chemical Geology*. **1971**, 8, 147-170.

³² 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.

³³ Atlas, R. M. *Microbiology Review*. **1981**, 45(1), 180-209.

³⁴ Berthe-Corti, L.; Fetzner, S. *Acta Biotechnology*. **2002**, 3-4, 299-336.

a oxidação do substrato por oxigenases com a utilização de oxigênio molecular como acceptor de elétrons. A oxidação terminal inicia-se com a formação de um álcool primário. Em seguida o álcool é oxidado a aldeído e posteriormente a ácido carboxílico, que por sua vez é utilizado como substrato pela acil-CoA sintetase e é biodegradado pelo processo de β -oxidação. A oxidação subterminal gera álcool secundário, cetona e éster. O éster é então biotransformado a álcool primário mais um ácido carboxílico por ação de esterases completando o ciclo até a β -oxidação, **Esquema 1**.



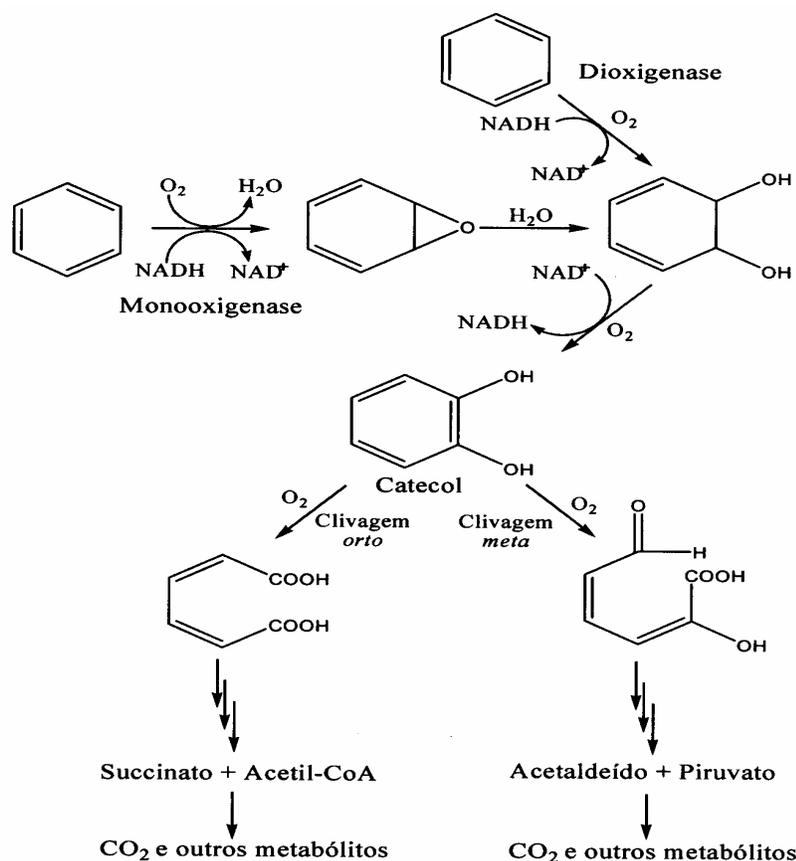
Esquema 1 – Rota de biodegradação aeróbia de alcanos.(adaptado de Wentzel *et al.*)³⁶

A biodegradação de compostos aromáticos também é iniciada pela ação de monoxigenases (mono- ou dioxigenases) que promove a oxidação do substrato formando dióis, seguida de clivagem do anel e formação de catecol

³⁵ Wentzel, A.; Ellingsen, T. E.; Kotlar, H-K.; Zotchev, S. B.; Throne-Holst, M. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

³⁶ Wentzel, A.; Ellingsen, t. E.; Kotlar, H-K.; Zotchev, S. B.; Throne-Holst, M.; *Applied Microbiology and biotechnology*. **2007**, 76, 1209-1221.

que é degradado diferentes intermediários, como acetaldeído, piruvato e succinato.^{37, 38}



Esquema 2 – Rota de biodegradação aeróbica de hidrocarbonetos aromáticos (adaptado de Fritsche *et al.*)³⁹

1.1.3 Triagem de alto desempenho

A alta variedade e complexidade da microbiota envolvida nos processos de biodegradação requer o uso de técnicas para a rápida triagem das atividades enzimáticas numa grande quantidade de microrganismos. Para isso, as técnicas de triagens de alto desempenho (*High-Troughput Screening* – HTS)

³⁷ Evans, P. J.; Ling, W.; Goldschmidt, B.; Ritter, E. R.; Young, L. Y.; *Applied Environment Microbiology*. **1992**, 58, 496-501.

³⁸ Berthe-Corti, L.; Höpner, T.; *Paleo*. **2005**, 219, 171-189.

³⁹ Fritsche, W.; Hofrichter, M.; In: *biotechnology*. **2000**, Vol. 11b (J. Klein, ed.), John Wiley & Sons, New York, p.146-164.

têm sido empregadas. Dentre os vários métodos que permitem o monitoramento da atividade enzimática no formato HTS, os ensaios fluorogênicos ou cromogênicos são os mais utilizados.⁴⁰

As vantagens desses métodos rápidos em relação aos métodos convencionais são a alta sensibilidade o que permite a utilização de pequenas concentrações de substrato e de biocatalizadores no formato de microplacas aumentando a velocidade das análises.⁴¹

⁴⁰ Bessler, M. K.; Jaeger, K. E. *Trends in Biotechnol.* **2006**, 6, 248-250.

⁴¹ Schimdt, M.; Bornscheuer, U. T.; *Biom. Eng.* **2005**, 22, 51-56.

2 Objetivos

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo estudar as microbiotas de dois reservatórios de petróleo, Campo Pintassilgo, da Bacia Potiguar (RN) e Campo Pampo Sul, Bacia de Campos (RJ) e a ação das mesmas sobre biomarcadores do petróleo. Os itens específicos de interesse para pesquisa foram:

1. Obter consórcios microbianos e microrganismos isolados de amostras de óleos do Campo Pintassilgo, da Bacia Potiguar (RN), através de enriquecimentos sob condições aeróbias.
2. Verificar o potencial enzimático dos consórcios, aplicando métodos de triagem enzimática de alto desempenho para avaliação de atividade de hidrolases.
3. Investigar a ação de consórcios e microrganismos isolados em biomarcadores de petróleo, através de ensaios de biocatálise convencional.
4. Avaliar a capacidade biodegradadora de microrganismos isolados de petróleo do Campo Pampo Sul, Bacia de Campos (RJ).
5. Avaliar a capacidade biodegradadora do consórcio do Campo Pintassilgo, Bacia Potiguar (RN) utilizando o petróleo direto no meio.

Por uma questão de coerência os três primeiros itens foram discutidos no capítulo I “Microbiota Aeróbia de Petróleo” e os dois últimos no capítulo II “Biodegradação Aeróbia de Petróleo”.

Capítulo I
“Microbiota Aeróbia de Petróleo”

1 Resultados e Discussões

1.1 Obtenção e identificação dos microrganismos

Existem muitos dados na literatura sobre a biodiversidade de espécies e ecossistemas encontrados no nosso país. As bacias e reservatórios de petróleo do território nacional também não escapam à regra quando falamos da sua diversidade de microrganismos. Sendo assim para recuperar a maior variedade possível da microbiota indígena cultivável de amostras de petróleo e água de formação do Campo Pampo Sul, Bacia de Campos (RJ) ²⁷ Co₂ e de petróleo do Campo Pintassilgo, Bacia Potiguar (Terra), RN CON 1, utilizaram-se diferentes meios de cultivo (NA, TSA, MA, GYM, Zinder) que apresentam composições diferentes de nutrientes. Variou-se ainda a porcentagem de NaCl adicionado para simular os diferentes ambientes de salinidade encontrados nos reservatórios.

Os consórcios obtidos foram denominados conforme o óleo utilizado, **Tabela 1**, Os microrganismos do Co₂ foram isolados num estudo anterior (Tese de doutorado de Georgiana F. da Cruz, IQ 2009) e ficando para este trabalho a avaliação da atividade enzimática

O isolamento do CON 1 foi realizado pelo método de esgotamento e conseguindo-se recuperar 30 microrganismos. A avaliação preliminar revelou uma grande variedade morfológica (cor, textura, etc.) desses microrganismos.

Tabela 1 – Características geoquímicas das amostras utilizadas no presente estudo.

Poço	Profundidade (m)	Indicadores geoquímicos de fonte ^{a,b} , biodegradação ^c e maturidade térmica ^d				Temperatura (°C)	Consórcio
		Esterano / Hopano ^a	C ₂₆ TT/ C ₂₅ TT ^b	NOR25/ H30 ^c	Ts / (Ts + Tm) ^d		
PS1 RN	801 - 803	0,05	1,96	-	0,54	48,3	CON 1
P1 RJ	2405-2588	0,35	1,20	0,06	0,24	82	Co2

^aCalculado 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); ^bCalculado a partir das respectivas áreas em *m/z* 191 de C₂₆ terpano tricíclico (TT) (22R + 22S) / C₂₅ terpano tricíclico (TT) (22R + 22S); ^cCalculado a partir das respectivas áreas em *m/z* 191 de C₂₉ 25-nor-17α(H) hopano / C₃₀ 17α,21β(H) hopano; ^dCalculado 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).

Esses microrganismos serão submetidos à identificação por técnicas de DNAr 16S, em trabalho com colaboração com a professora Valéria do CPQBA – UNICAMP.

1.2 Triagem de alto desempenho

Com o intuito de se obter maiores informações a respeito do arsenal enzimático desses microrganismos foram feitos ensaios miniaturizados evidenciando as reações químicas catalisadas por enzimas através de sinais fluorescentes provenientes de sondas fluorogênicas.⁴² Esse formato é adequado para os ensaios de triagens de alto desempenho e se tornam ferramentas essenciais para exploração da biodiversidade na busca de novas

⁴² Goddard, J. P.; Reymond, J. L.; *Trends in Biotechnol.* **2004**, 22, 363-370.

enzimas, principalmente quando há uma enorme quantidade de microrganismos a serem testados.⁴³ Eles consistem na utilização de um substrato capaz de liberar um cromóforo ou fluoróforo como consequência da ação enzimática.^{42, 44}

Portanto, os microrganismos isolados foram submetidos a ensaios enzimáticos, usando um modelo que utiliza substratos fluorogênicos e enzimas isoladas, inicialmente desenvolvidas por Reymond e colaboradores, e mais tarde adaptado para células íntegras em colaboração com o nosso grupo.

Os ensaios consistem numa seqüência de reações iniciada pela ação enzimática sobre os substrato fluorogênico (**1-5**) que se transformam num diol (**6**) que seguido de oxidação por NaIO₄ leva ao composto carbonílico **7**, o qual origina o íon fluorescente umbeliferila (**8**) através de uma β-eliminação catalisada pela albumina do soro bovino (BSA). A eficiência de cada microrganismo frente às sondas de esterases (ES1, ES2 e LIP) e epóxido-hidrolases (EP1 e EP2) pode ser quantificada a partir da medida do sinal de fluorescência, **Esquema 3**.

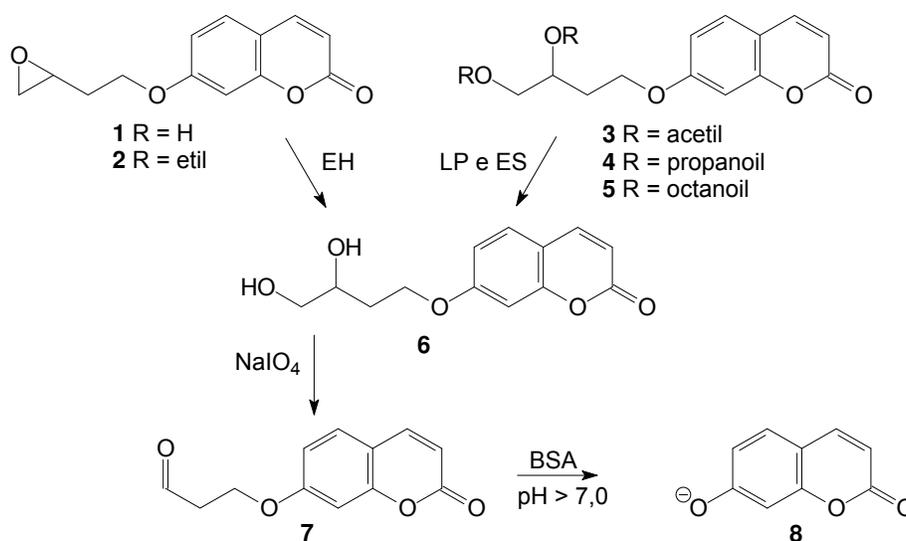
Para os ensaios foram utilizadas cinco sondas fluorogênicas, as quais foram inicialmente sintetizadas pela Dra. Luciana de Oliveira e pela Dra. Lu Shi Chen. Para detecção de epóxido-hidrolase foram utilizadas duas sondas, a 7-(1,2-epóxibutóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (**1**) e a 7-(3,4epóxi-hexilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (**2**). Para a detecção de esterases foram utilizadas três sondas sendo a 7-(1,2-diacetato-butóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (**3**) para detecção de hidrólise de acetatos, a 7-(1,2-propionato-butóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (**4**) para a detecção de hidrólise de propionatos e a 7-(1,2-

⁴³ Wahler, D.; Boujard, o.; Lefreve, F.; Reymond, J. L.; *Tetrahedron*. **2004**, 60, 703-710.

⁴⁴ Reymond, J. L.; *Enzyme Assays*. **2004**, 22, 51-56.

octanoato-butóxi)-2H-1-benzopirran-2-ona (**5**) para a detecção de hidrólise de octanoatos. Além disso, foram sintetizados os controles positivos 7-(1,2-diidróxi-butóxi)-2H-1-benzopirran-2-ona (**6**) e 7-(3,4-diidróxi-hexilóxi)-2H-1-benzopirran-2-ona.

O preparo de duas sondas fluorogênicas para detecção da atividade de lipases com ésteres de C₁₆ e C₁₈ não foi bem sucedida e será sem sucesso no preparo das sondas.



Esquema 3 – Reações envolvidas no processo de triagem para as sondas de lipase(5), esterase (3 , 4) e epóxido hidrolase (1 e 2).

Os ensaios foram feitos em duplicata em microplacas de polipropileno com 96 cavidades (fundo plano) e monitoradas por leitor de fluorescência (Flashscan 530 Analytic Jena) após 24 horas de reação, utilizando filtros de comprimento de onda de excitação de 365 nm e de leitura de 460 nm. Foram realizados também controles negativos para monitorar a intensidade de fluorescência liberada pela hidrólise não enzimática dos substratos, controles positivos para avaliar uma possível interferência na fluorescência do produto

resultante da reação de biotransformação e o controle microbiano para monitorar possível autofluorescência dos microrganismos.

O tratamento dos dados foi feito pela diferença entre a média dos valores de intensidade de fluorescência dos ensaios com microrganismos (FE) e a média de intensidade de fluorescência emitida pelo controle negativo (FN) e esta foi convertida em porcentagem considerando como 100% o controle positivo (FP).

Dos 63 microrganismos, previamente isolados, ²⁵ do Co2 foram selecionados 10 microrganismos (*Bacillus pumilus*) que apresentaram atividade significativa frente às sondas fluorogênicas, **Tabela 2**, os quais foram utilizados nos ensaios de biodegradação com petróleo (Capítulo II).

Tabela 2 - Atividades enzimáticas (hidrolases) em bactérias isoladas do Co2 (% de conversão)*.²⁷

MO	Sondas					MO	Sondas				
	EP1	EP2	ES1	ES2	LIP		EP1	EP2	ES1	ES2	LIP
SG04	2%	6%	2%	7%	75%	SG26	0,4%	2%	1%	5%	77%
SG10	2%	7%	0,5%	2%	17%	SG27	0,5%	5%	3%	17%	81%
SG12	2%	6%	2%	3%	46%	SG29	3%	9%	0,6%	3%	35%
SG13	1%	6%	3%	18%	51%	SG30	2%	8%	1%	7%	6%
SG16	0,6%	7%	0,3%	1%	11%	SG42	2%	5%	0,9%	2%	1%

Já dos 30 microrganismos isolados de CON1, 13 apresentaram resultados positivos para uma das sondas de epóxido hidrolase (EP1), 17 apresentaram resultados positivos para pelo menos uma das sondas de esterase e 7 apresentaram resultados positivos para a sonda de esterase com uma cadeia lateral maior, **Tabela 3**.

Tabela 3 – Atividades enzimáticas (hidrolases) em bactérias isoladas do CON1 (% de conversão)*.

MO	Sondas					MO	Sondas				
	EP1	EP2	ES1	ES2	LIP		EP1	EP2	ES1	ES2	LIP
CFA01	3%	0%	7%	34%	1%	CFA16	16%	0%	2%	14%	2%
CFA02	2%	0%	3%	25%	1%	CFA17	8%	0%	12%	13%	0%
CFA03	5%	0%	10%	40%	1%	CFA18	4%	0%	0%	2%	0%
CFA04	0%	0%	0%	0%	0%	CFA19	11%	0%	54%	>99%	0%
CFA05	8%	0%	2%	12%	0%	CFA20	4%	0%	16%	70%	0%
CFA06	11%	0%	12%	24%	31%	CFA21	36%	2%	63%	>99%	0%
CFA07	15%	1%	36%	>99%	34%	CFA22	20%	0%	>99%	82%	0%
CFA08	4%	0%	0%	0%	1%	CFA23	3%	0%	0%	0%	0%
CFA09	9%	1%	19%	77%	33%	CFA24	3%	0%	0%	0%	1%
CFA10	2%	0%	1%	1%	0%	CFA25	0%	0%	0%	0%	0%
CFA11	3%	0%	0%	1%	0%	CFA26	8%	0%	3%	0%	0%
CFA12	2%	0%	0%	1%	1%	CFA27	8%	2%	2%	5%	9%
CFA13	3%	0%	0%	1%	0%	CFA28	2%	0%	1%	1%	9%
CFA14	1%	0%	5%	29%	5%	CFA29	2%	1%	1%	4%	8%
CFA15	8%	0%	42%	27%	0%	CFA30	0%	0%	5%	25%	0%

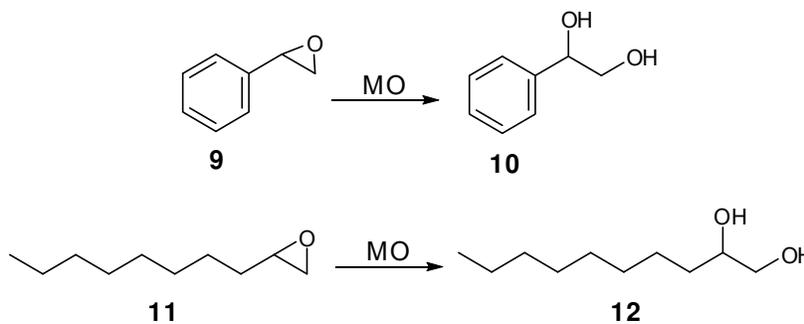
Um fato interessante foi que os microrganismos recuperados da Bacia de Campos foram mais ativos frente às sondas de epóxido mais impedidos (EP2) e os ésteres de maior cadeia lateral (LIP), enquanto que os microrganismos recuperados da Bacia Potiguar foram mais ativos frente às sondas de epóxido menos impedidos (EP1) e os ésteres de menor cadeia lateral (ES1 e ES2).

1.3 Biotransformação com substratos não fluorogênicos

Para estes ensaios utilizou-se a técnica de multibioreações, onde as reações catalisadas por um microrganismo são monitoradas na presença de vários substratos num mesmo pote reacional. Essa técnica permite avaliar rapidamente a eficiência enzimática dos microrganismos frente a substratos de interesse. As multibioreações foram realizadas as bactérias isoladas que apresentaram atividade frente às sondas fluorogênicas com substratos de interesse e serão discutidas abaixo.

1.3.1 Substratos de interesse sintético

Para confirmar os resultados obtidos através dos ensaios de HTS realizaram-se ensaios de biocatálise tradicional com substratos não fluorogênicos.⁴⁵ Dentre os microrganismos que se destacaram para a atividade de epóxido-hidrolase frente às sondas fluorogênicas, realizaram-se ensaios de biocatálise tradicional utilizando como substratos o (±) 1,2-epoxi-1-feniletano (**9**) e o (±) 1,2-epoxidecano (**11**) a fim de determinar os valores de conversão frente a esses substratos de interesse sintético, **Esquema 4**. As reações foram monitoradas por CG/EM, **Tabela 4**.



Esquema 4 – Reação de hidrólise de **9** e **11**.

⁴⁵ Ensaios realizados em conjunto com a aluna de graduação Bruna Karla.

Tabela 4 – Rendimento de hidrólise de **9** e **11** após 96 h de reação.

Microrganismo	% conversão	
	10	12
CFA03	15,7	4,0
CFA05	43,6	6,1
CFA06	5,2	1,7
CFA07	14,5	1,2
CFA09	23,2	*
CFA15	13,6	*
CFA21	6,2	10,0
CFA22	32,0	2,8

* não houve detecção do produto.

Todos os ensaios foram monitorados a cada 24 horas, e em alguns casos pôde se observar que houve o consumo do diol (**12**), formado a partir de **11**, que variou de 25 a 40 %, porém não foi possível observar nenhum produto desse consumo. Os valores de conversão foram obtidos pelo cálculo da concentração do produto através da coinjeção de um padrão interno (heptadecano) com uma concentração conhecida. Para o cálculo da conversão utilizou-se área dos produtos.

1.3.2 Classe de substratos presentes no petróleo

A atividade enzimática depende muito do substrato e embora a triagem de alto desempenho (HTS) fornece uma avaliação rápida não significa que a mesma seja relevante para os componentes do petróleo e seus derivados assim foi feita uma avaliação da ação dos microrganismos isolados sobre alguns representantes das principais classes de biomarcadores do petróleo. Para tanto foi aplicado o protocolo de multibioreações com substratos semelhantes à biomarcadores presentes no petróleo: 5α -colestano-3-ona (**13**), ácido

nonadecanóico (**14**), esqualano (**15**), 4-colesten-3-nona (**16**), fenantreno (**17**), 9,10-diidrofenantreno (**18**),

Figura 2. ^{46 47}

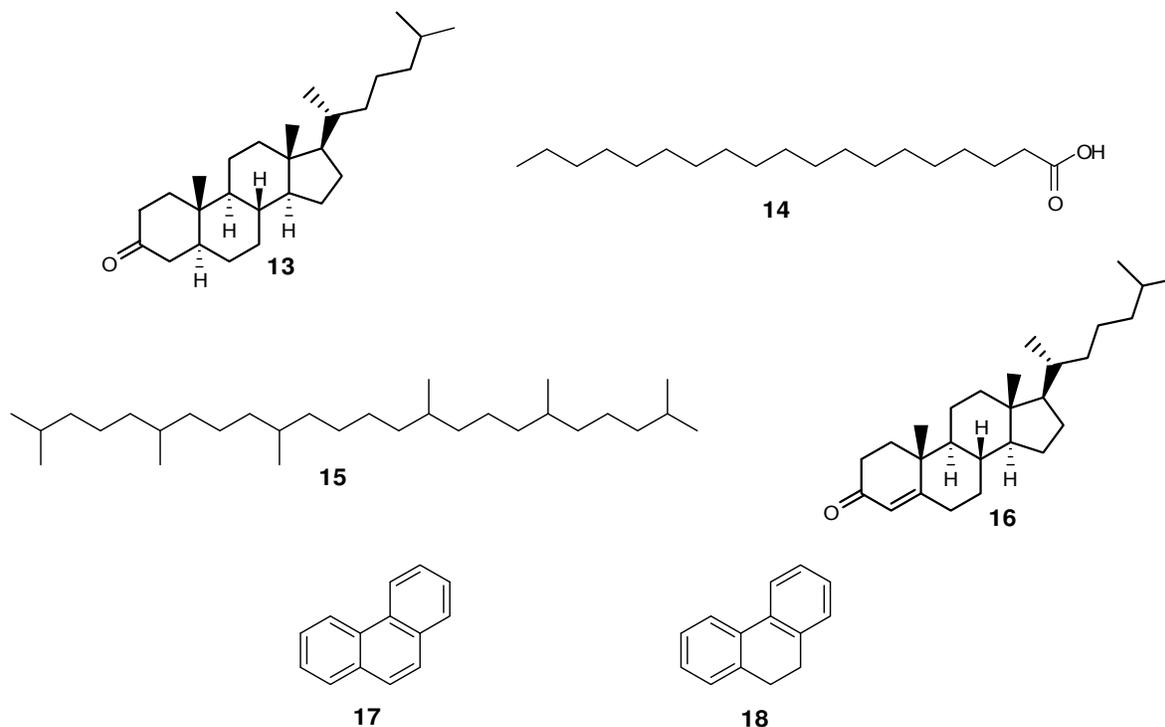


Figura 2 – Substratos utilizados nas multibioreações, cujos esqueletos são representantes de algumas classes de compostos presentes no petróleo.

Os microrganismos listados a seguir e que apresentaram melhores resultados frente às sondas fluorescentes foram selecionados para a realização dos ensaios: CFA 03, 06, 07, 09, 14, 15, 16, 17, 19, 20 e 21. Cabe ressaltar que as interpretações dos resultados são preliminares e mais estudos envolvendo a síntese de padrões para confirmar as estruturas sugeridas a partir das análises dos espectros de massas e da comparação dos mesmos com dados da literatura (Apêndice 1).

⁴⁶ Ensaios realizados em conjunto com a doutoranda Francine Fonseca.

⁴⁷ Sendo que em determinado momento a 5 α -colestan-3-ona (**13**) foi substituída por 4-colesten-3-nona (**16**) e o 9,10-diidrofenantreno (**18**) pelo fenantreno (**17**), devido a falta dos reagentes.

Na **Figura 3** temos o cromatograma da amostra controle onde podemos visualizar os substratos avaliados, contudo os cromatogramas dos ensaios serão apenas mostrados quando houver resultados.

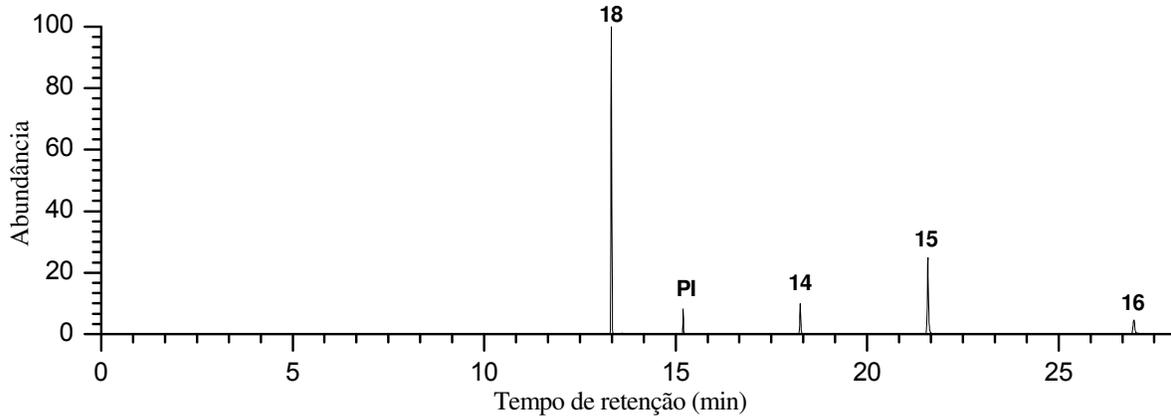


Figura 3 – Cromatograma da amostra controle dos ensaios de multibioreação com classes de compostos presentes no petróleo.

Nos ensaios com o microrganismo CFA 21, percebeu-se que com 7 dias já houve total remoção do ácido nonadecanóico (**14**) mas sem detecção dos subprodutos dessa degradação o que poderia indicar uma incorporação passiva desse composto pelas células. Pôde-se detectar a degradação do 9,10-diidrofenantreno (**18**) dando origem aos produtos 9,10-diidro-9,10-diidroxfenantreno (**20**), 9,10-diidro-9-hidroxfenantreno (**19**), 9,10-diidroxfenantreno (**25**) e 9-hidroxfenantreno (**21**), **Figura 4**.

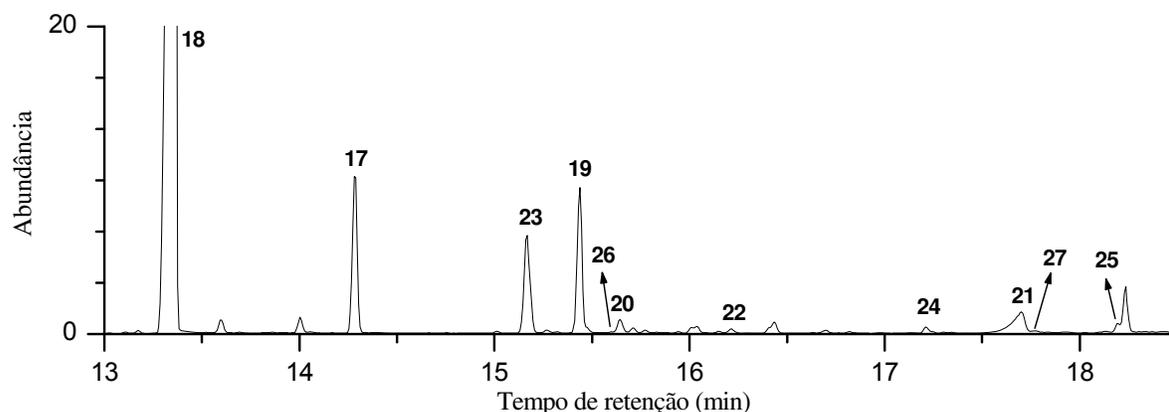


Figura 4 – Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualeno (**15**), ác. Nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10 diidrofenantreno (**18**).

A análise dos produtos indica que neste processo houve a atuação de uma monoxigenase e uma dioxigenase. Pois, mesmo que **21** possa ser obtido da desidratação de **20**, o **19** teria que ser obtido pela ação de uma monoxigenase (**Esquema 5**).⁴⁸

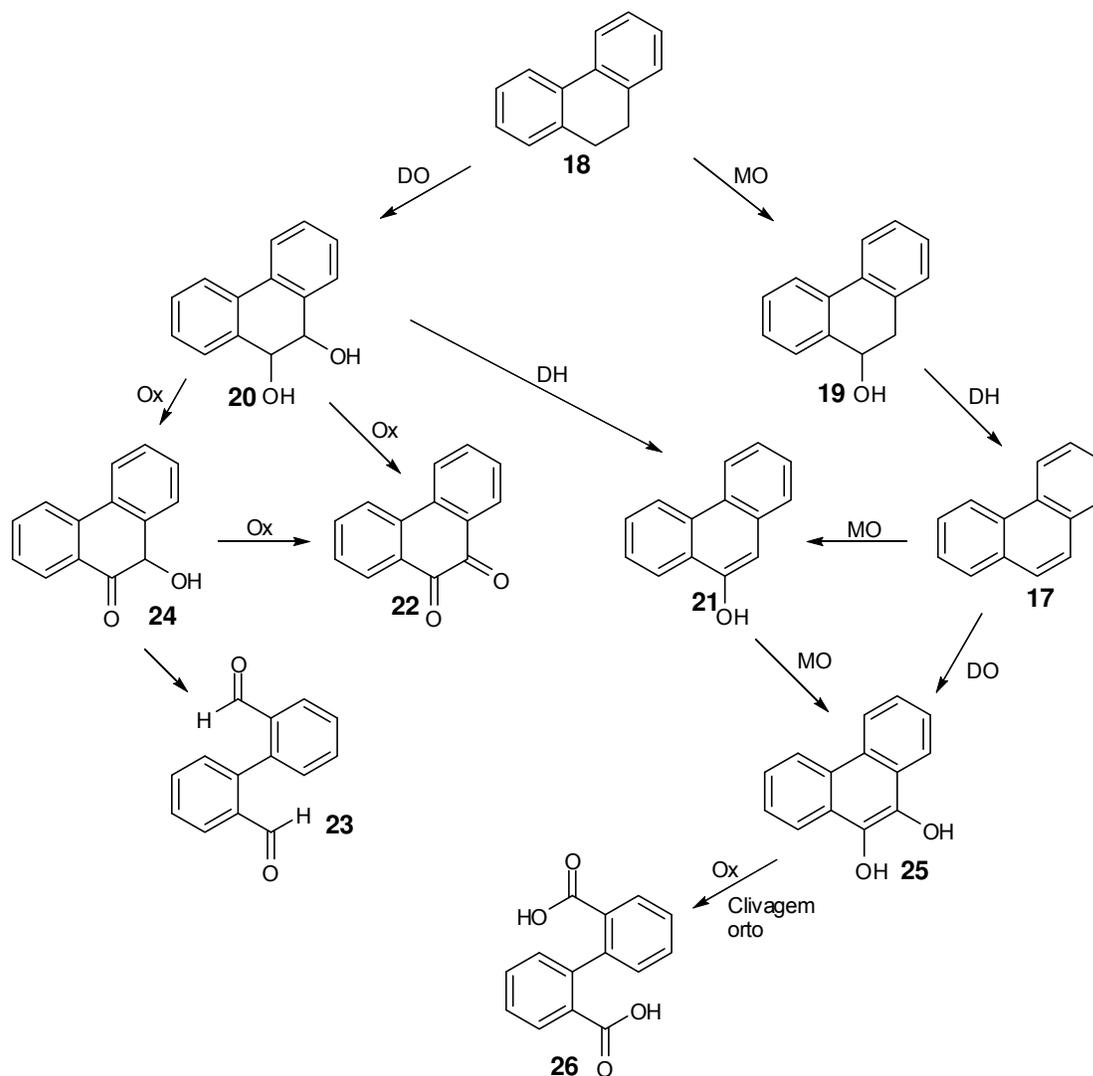
A 9,10-fenantrenodiona (**22**) também detectada pode ter sido originada da oxidação de **20** e/ou **25**, porém a presença de 10-hidroxi-9,(10H)-fenantrenona (**24**) indica que **22** poderia ser formado de **20**. O ácido (1,1'-bifenil)-2,2'-dicarboxílico (**26**), detectado como ester metílico, pode ter sido originado da clivagem orto de **25**, e o (1,1'-bifenil)-2,2'-dicarboxaldeído (**23**) poderia ter origem numa retro condensação de aciloína (acyloin condensation) de **24**.^{49, 50} Com base nestes produtos é possível sugerir a rota catabólica do 9,10-diidrofenantreno por essa bactéria, **Esquema 5**. Onde mais estudos precisam ser realizados para desvendar a real seqüência de degradação. Entretanto fica claro que se isolou uma bactéria com grande

⁴⁸ Herwijnen, R.; Wattiau, P.; Bastiaens, Daal, L.; Jonker, L.; Springael, D.; Govers, A. J.; Parsons, J. R. *Research in Microbiology*. **2003**, 154, 199-206.

⁴⁹ Moody, J. D.; Freeman, J. P.; Doerge, D. R. Cerniglia, C. E. *Applied an Environmental Microbiology*. **2001**, 1476-1483.

⁵⁰ Faber, K.; Ghisalpa, O.; Godtfredsen, S. E.; Godtfredsen, H. L. *et al.* In: “Biocatalyst for fine Chemical Synthesis”. **1999**, John Wiley & Sons, New york

potencial para degradação de compostos aromáticos um assunto de interesse da Petrobrás.



Esquema 5 – Rota de degradação proposta para o 9,10-diidrofenantreno para o microorganismo CFA21.

Outro composto biotransformado por esse microorganismo foi a 4-colesten-3-nona (16), dando origem a três produtos de degradação: a 7-colesten-3-ona (28), onde houve uma isomerização da dupla ligação, a 3-colestanona (29) onde houve a redução da dupla na posição 4 e a colesta-4,6-dien-3-ona (30) onde houve uma desidrogenação aumentando as insaturações,

Figura 5 e Esquema 6, reações estas realizadas por enzimas capazes de oxidar e reduzir esse substrato.

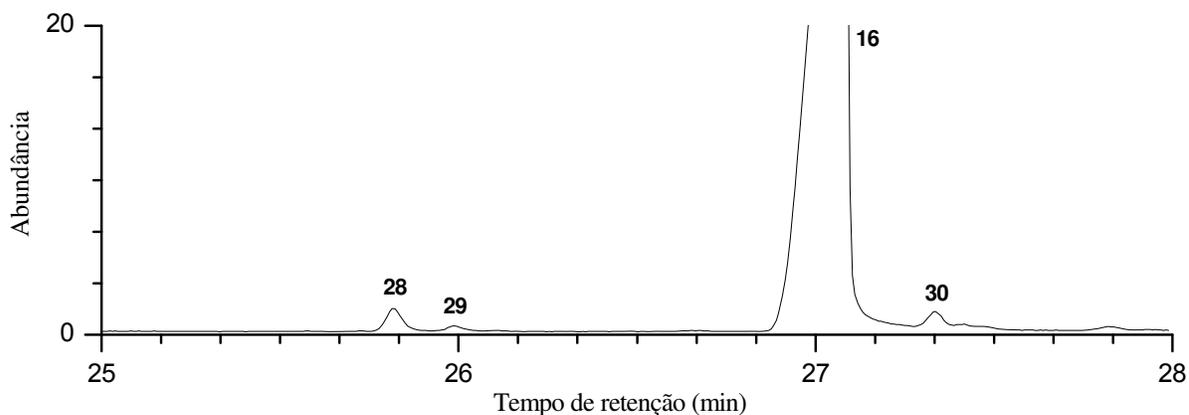
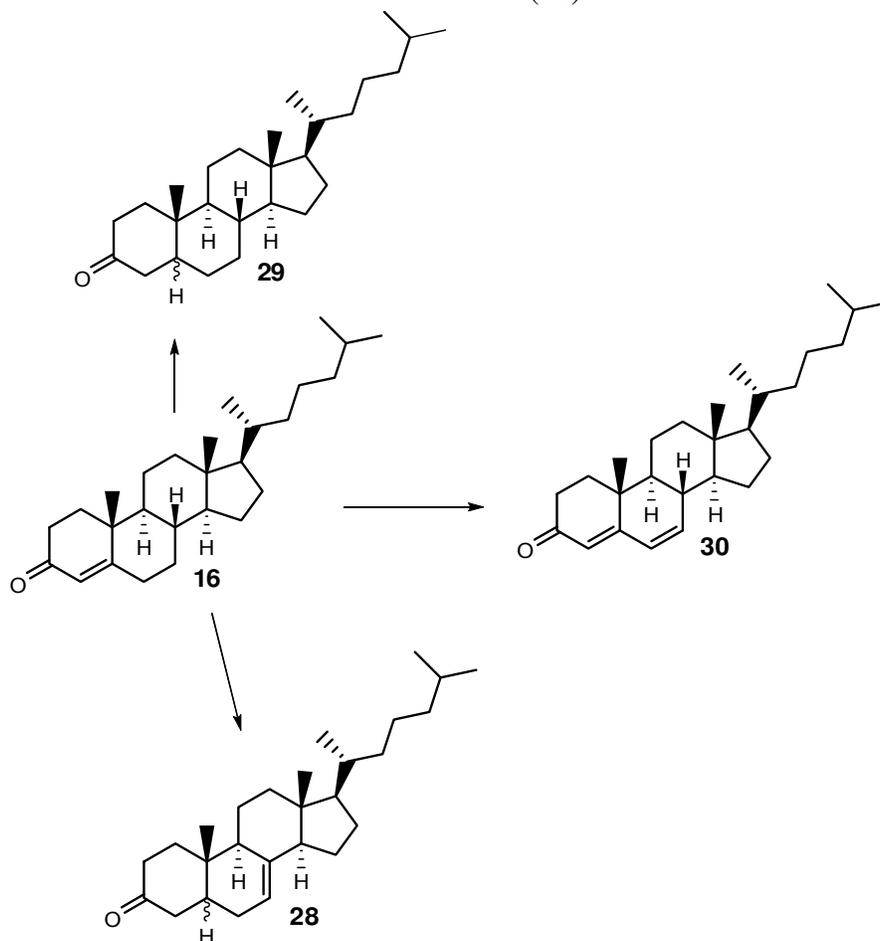


Figura 5 - Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (15), ác. Nonadecanóico (14), 4-colesten-3-ona (16) e 9,10 diidrofenantreno (18).



Esquema 6 – Intermediários da degradação da 4-colesten-3-ona obtido através do CG/EM do ensaio com o microrganismo CFA 21.

Outro microrganismo que apresentou biotransformação dos compostos foi o CFA03 que com 21 dias já havia consumido praticamente todo ácido nonadecanóico e iniciado a degradação da 4-colesten-3-nona com surgimento de **30**, **Figura 6**.

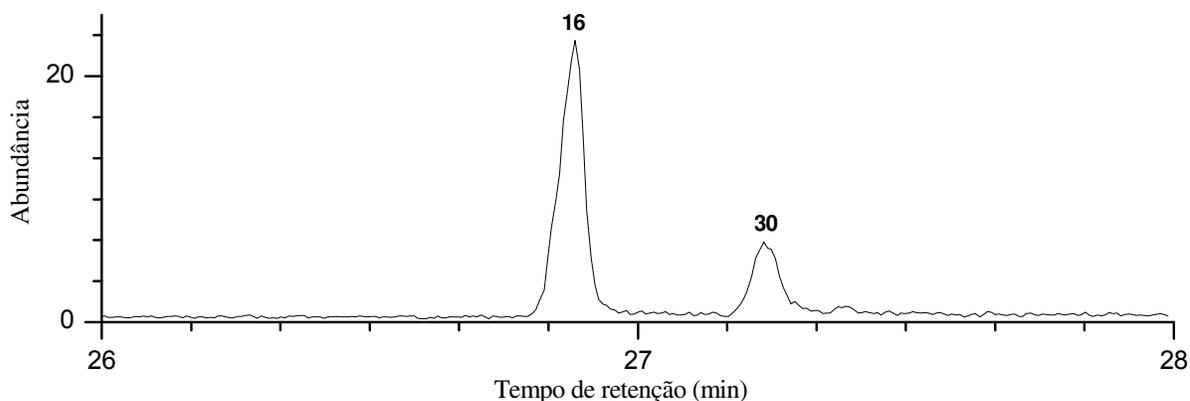


Figura 6 - Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 21 dias de reação com o microrganismo CFA 03 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**).

Após 28 dias houve também o consumo do fenantreno com surgimento de **32** e **33**, **Figura 7** e **Esquema 7**, possivelmente devido à ação de uma dioxigenase seguido de uma clivagem orto (**33**) e redução dos anéis, enquanto que o espectro de massas do composto **32** indica que este composto possui um oxigênio e uma insaturação a menos que **33**.

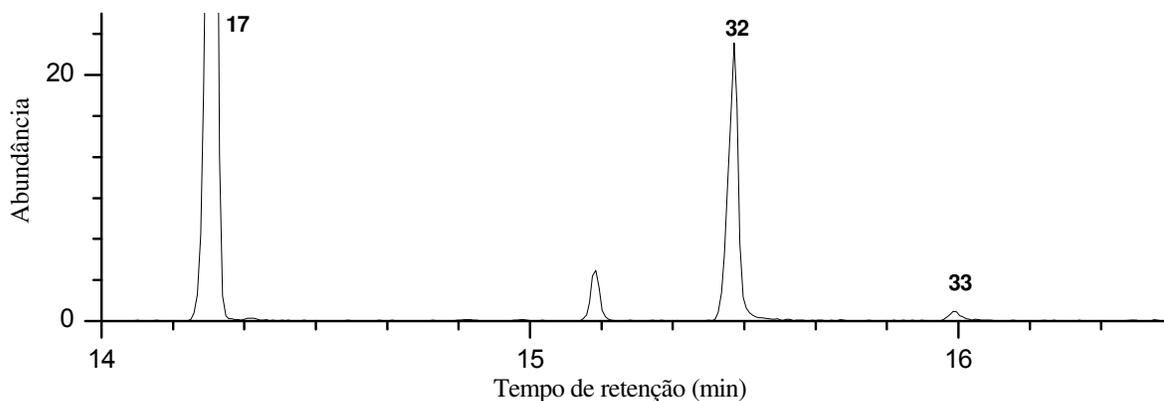
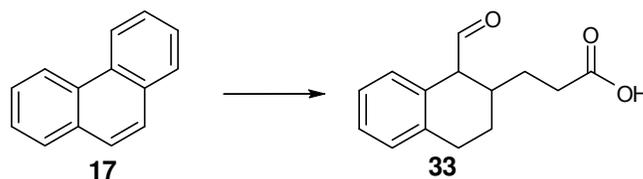


Figura 7 - Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 28 dias de reação com o microrganismo CFA 03 utilizando esqualano (**15**), ácido nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**).



Esquema 7 – Intermediários de degradação do fenantreno obtidos através do CG/EM do ensaio com o microrganismo CFA 03.

O microrganismo CFA 06 também foi capaz de degradar o ácido nonadecanóico (**14**) e o 9,10-diidrofenantreno (**18**), e assim como no CFA21 foi possível observar alguns intermediários da degradação do diidrofenantreno (**17**, **19**, **21**, **22** e **25**), após 21 dias de reação. Ele também foi capaz de degradar a 4-colesten-3-ona produzindo epóxido da 4-colesten-3-ona (**34**) e o **36** que com base no espectro de massas sugere-se que seja uma 4-colesten-3-ona com inserção de uma hidroxila na cadeia lateral, possivelmente devido à ação de uma monoxigenase tipo P450, **Figura 8** e **Esquema 8**. Adicionalmente foi detectado o composto **35** cujo espectro de massas era compatível com a 3-colestanona mostrando a existência de enzimas capazes de realizar reações de redução, **Esquema 8**.

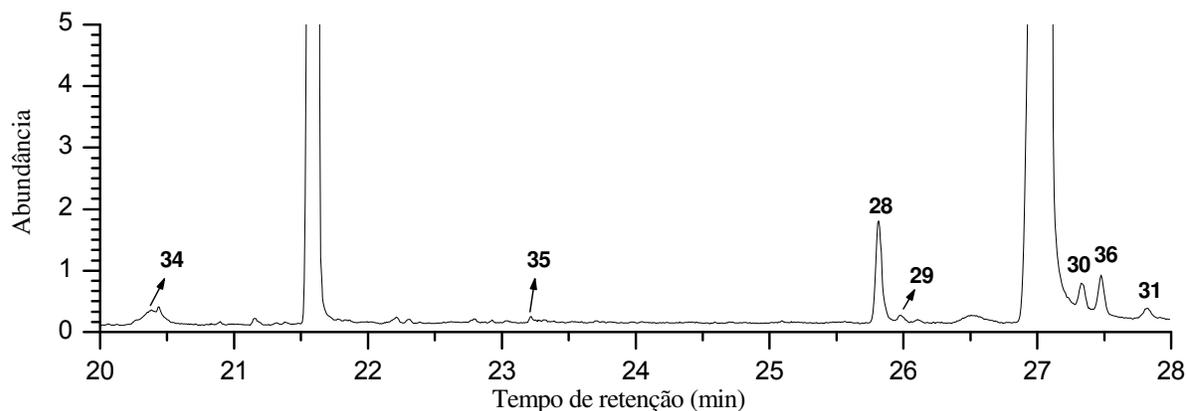
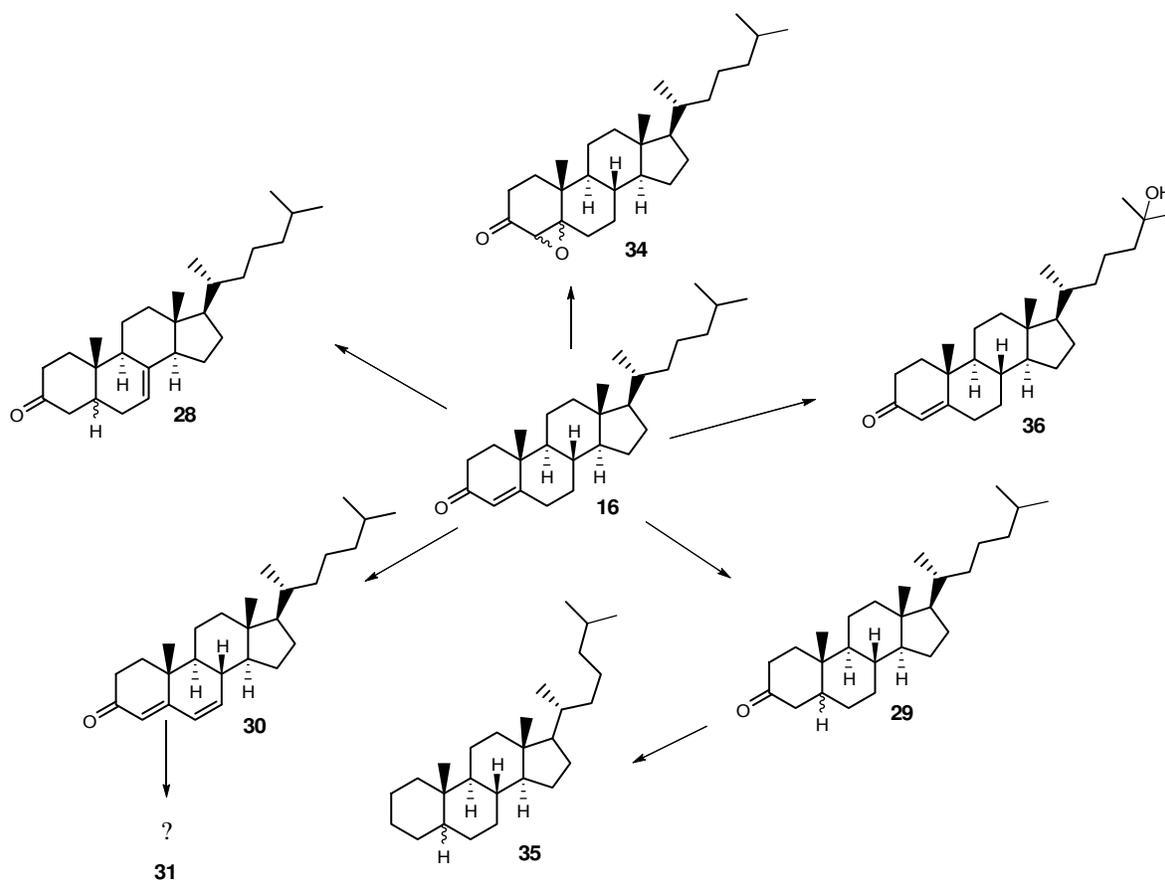


Figura 8 - Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 21 dias de reação com o microrganismo CFA 06 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10-diidrofenantreno (**18**).



Esquema 8 – Intermediários de degradação da 4-colesten-3-ona obtidos através do CG/EM do ensaio com o microrganismo CFA 06, após 21 dias de reação.

Já o CFA 20 diferente dos demais iniciou a biodegradação do ácido nonadecanóico (**14**), com 14 dias de ensaio, porém dessa vez foi possível observar alguns intermediários dessa transformação, **Figura 9**. O interessante foi que diferente do que se costuma observar onde a degradação de ácidos ocorre com a perda de dois átomos de carbono, neste experimento observou-se a perda de um átomo de carbono,

Figura 10. Entretanto não se pode descartar a hipótese ser um metabólito do microorganismo.

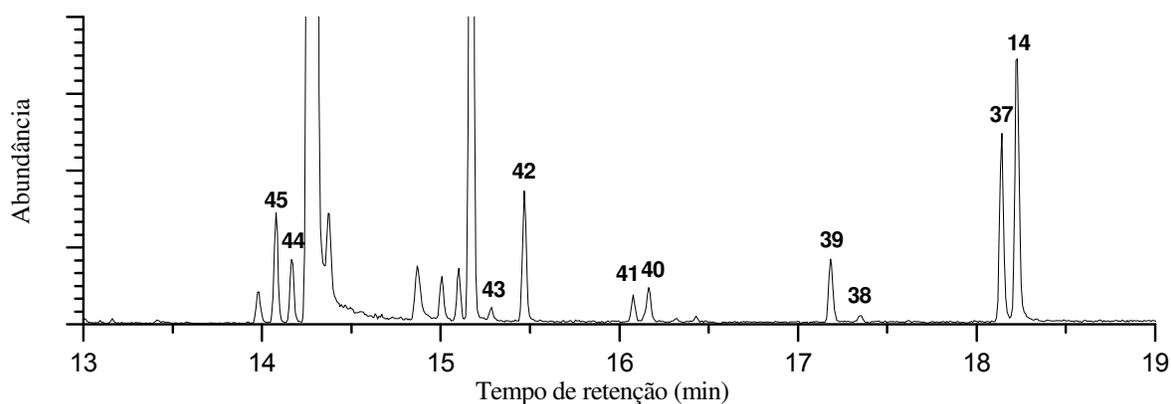


Figura 9 - Cromatograma de íons (CG/MS) obtido após 14 dias de reação com o microorganismo CFA 20 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**).

O CFA 20 assim como o CFA 14, 16 e 19 também foi capaz de degradar a 4-colesten-3-nona (**16**), e em todos foi possível observar os intermediários **28**, **30** e **36**. Os demais microrganismos (CFA 07, 09, 15e 17) não apresentaram biodegradação significativa dos compostos testados.

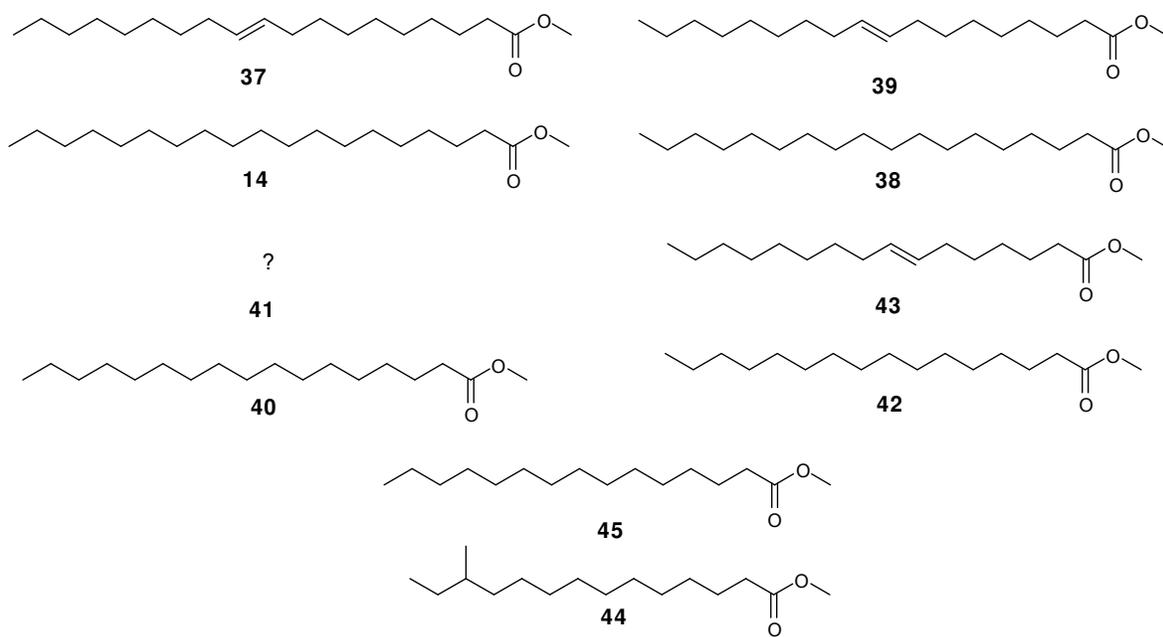


Figura 10 – Intermediários de degradação do ácido nonadecanóico obtidos através do CG/EM do ensaio com o microrganismo CFA 20, após 14 dias de reação.

2 Conclusão

O estudo das atividades enzimáticas mostrou a existência de lípases, esterases, epóxido-hidrolases, mono e dioxidases, redutases e até algumas ligases responsáveis por reações de formação e/ou rompimento de ligações carbono-carbono como na clivagem orto das moléculas aromáticas ou nas reações de retro condensação de aciloína. Atividades essas importantes na degradação do petróleo e outras fontes de carbono.

Os ensaios de multibioreações apresentaram também resultados importantes na degradação de classes de compostos como os aromáticos, que corroboram para o uso desses microrganismos em técnicas de biorremediação de solos e águas contaminadas. Contudo mais estudos precisam ser realizados para que se tenha um melhor entendimento do metabolismo de degradação desses microrganismos para encontrar mais aplicações para esses microrganismos de ambiente extremos.

Capítulo II
“Biodegradação de Petróleo”

1 Resultados e Discussões

1.1 Microrganismos isolados do Campo Pampo Sul, Bacia de Campos

Dando continuidade ao trabalho anterior,²⁷ cujo objetivo é o entendimento do processo de biodegradação do petróleo realizaram-se ensaios com microrganismos previamente isolados de amostras de óleos e águas de formação da Bacia de Campos. Dos microrganismos isolados selecionaram-se os que tiveram maior atividade frente às sondas fluorogênicas (hidrolases), os quais foram utilizados nos ensaios de biodegradação com petróleo (**P1**) como principal fonte de carbono, estes foram realizados em duplicata e o monitoramento se deu em intervalos de 30 e 60 dias. Os experimentos foram realizados com os microrganismos ainda em fase *log* de crescimento.

O extrato orgânico do experimento de biodegradação foi então fracionado em coluna de sílica gel⁵¹ fornecendo três frações F1 (saturados), F2 (aromáticos pesados) e F3 (asfaltenos). As frações F1 foram então analisadas por CG/EM onde foi possível acompanhar o processo de biodegradação ocorrido nas classes de compostos abaixo listados:

- *n*-Alcanos (parafinas normais) e isoprenóides (isoparafinas);
- Terpanos bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos (hopanos e norhopanos);
- Alquilbenzenos e alquilocicloexanos.
- Fenantrenos e alquilfenantrenos.

⁵¹ Cruz, G. F. *Tese de Doutorado* – Instituto de Química – UNICAMP – 2009.

Para avaliar o processo de biodegradação foi necessário realizar análises utilizando o monitoramento de todos os íons (*total ion chromatogram – TIC*) e monitoramento seletivo de alguns íons característicos das principais classes de biomarcadores (*Reconstructed Ion Chromatogram – RIC e Single Ions Monitoring – SIM*), **Tabela 5**.

Tabela 5 – Biomarcadores monitorados e seus respectivos íons-fragmentos característicos.

Classe de biomarcadores	Íons-fragmentos monitorados (<i>m/z</i>)
Alcanos lineares e isoprenóides	71, 183
Terpanos triciclos e tetracíclicos	123, 191
Terpanos pentacíclicos (hopanos)	191
Hopanos desmetilados (norhopanos)	177
Esteranos regulares	177
Alquilbenzenos	92, 106
Alquilfenantrenos	192, 206
Alquilcicloexanos	82

Analisando a fração alifática da amostra de óleo P1, **Figura 11**, observa-se a presença de hidrocarbonetos de nC_{14} a nC_{33} com um máximo em nC_{16} a nC_{19} , indicando uma amostra levemente biodegradada de acordo com a escala de Peters & Moldowan (nível 1 - 2), **Figura 12**. A análise do IPC mostrou que a amostra tem uma predominância de alcanos com número ímpar de carbonos sobre os com número par ($IPC > 1,00$; Índice de Preferência de Carbono, $IPC_{14-33} = [2 \times \Sigma(nC_{15} \text{ a } nC_{33})] / [nC_{14} + 2 \times \Sigma(nC_{16} \text{ a } nC_{30}) + nC_{32}]$).

1.1.1 *n*-Alcanos e isoprenóides

Inicialmente avaliou-se a biodegração na classe dos hidrocarbonetos lineares, estes que constituem a maior parte de um petróleo pouco biodegradado, e que são os mais susceptíveis a degradação microbiológica.

Os padrões de distribuição dos *n*-alcanos podem ser utilizados como parâmetros para determinação de algumas características do óleo como, por exemplo, origem da matéria orgânica.⁴ Sabe-se que rochas geradoras imaturas ou que se formam da deposição de matérias orgânica de plantas terrestres apresentam hidrocarbonetos ímpares em maior quantidade (IPC > 1), principalmente os de cadeias longas (C₂₇, C₂₉, C₃₁). Já no caso de matéria orgânica de origem marinha carbonática e evaporítica (hipersalino), e óleos mais maduros observa-se uma pequena predominância de hidrocarbonetos pares ou nenhuma preferência (IPC ~ 1).

O íons de *m/z* 71 (RIC) foi selecionado para o monitoramento seletivo desta classe de compostos e a análise dos cromatogramas revelou que alguns dos microrganismos tiveram uma maior preferência para biodegradar *n*-alcanos de menor peso molecular (SG 10 e 12), **Figura 13**, enquanto em outros essa preferência já não foi tão evidenciada e a biodegradação se deu de maneira mais uniforme. No total cinco microrganismos (SG 10, 12, 13, 29, 42) apresentaram biodegradação bastante significativa, para essa classe, no período avaliado.

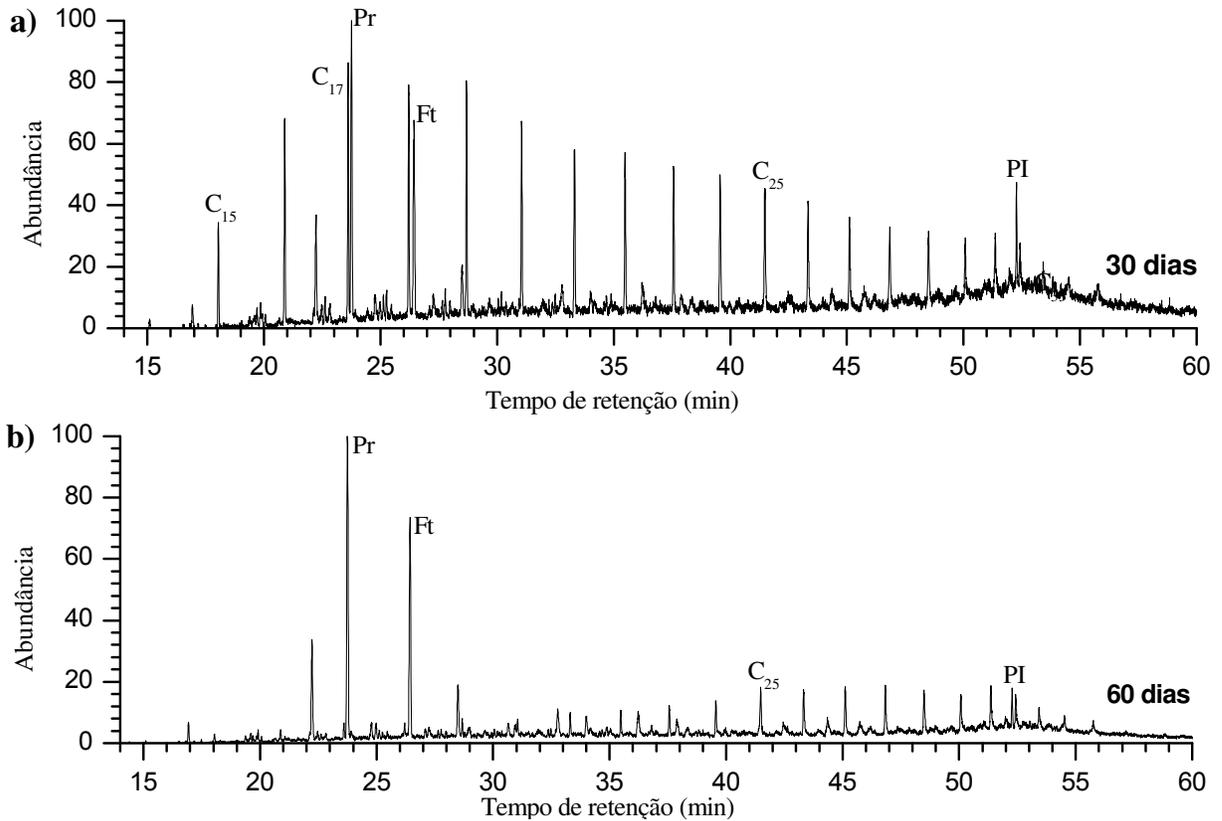


Figura 13 – RIC m/z 71 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 biotransformado por: **a)** *Bacillus pumilus* (SG10) 30 dias **b)** *Bacillus pumilus* (SG10) 60 dias.

Destes cinco microrganismos, dois (SG 12 e 29) foram capazes de biodegradar o pristano e o fitano quase que simultaneamente aos hidrocarbonetos lineares o que não é comum já que no geral hidrocarbonetos ramificados são mais resistentes a biodegradação, **Figura 14**.

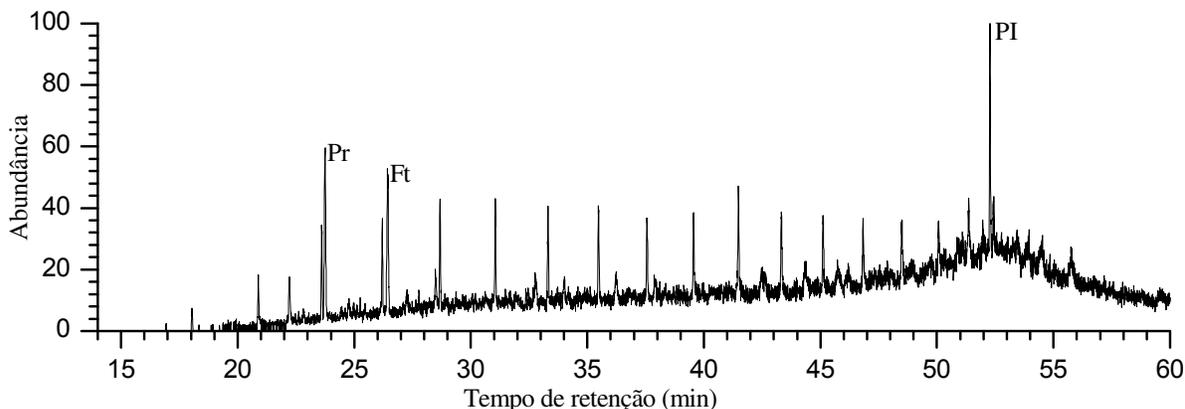


Figura 14 – RIC m/z 71 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 biotransformado por *Bacillus pumilus* (SG12) 60 dias.

A análise dos parâmetros de biodegradação revelou que a maioria dos microrganismos isolados (SG 10, 12, 26, 30 e 37) apresentou maior preferência pelos hidrocarbonetos pares (IPC), **Tabela 6**, e também como já era esperado os hidrocarbonetos lineares foram mais biodegradados que os ramificados (Pr/n-C17 e Ph/n-C18) até mesmo quando esses eram biodegradados, sendo o pristano biodegradado preferencialmente, **Tabela 6**.

Contudo também tivemos microrganismos (SG 16 e 29) que biodegradaram preferencialmente os hidrocarbonetos ímpares.

Em resumo observou-se que alguns microrganismos foram capazes de biodegradar preferencialmente hidrocarbonetos pares (aumento do IPC), enquanto outros biodegradavam preferencialmente os ímpares (diminuição do IPC). Com isso o IPC, quando houver biodegradação, é um parâmetro não recomendável para caracterização de um óleo e deve ser utilizado em conjunto com outros parâmetros.

Tabela 6 - Parâmetros de biodegradação para os ensaios com microrganismos isolados.

Microrganismo	Período (dias)	Parâmetro			
		IPC	Pr/n-C17	Ph/n-C18	Pr/Ph
Controle	30	1,08	1,13	0,90	1,45
	60	1,12	1,13	0,94	1,31
SG 10	30	1,25	1,51	1,28	1,34
	60	1,41	-	-	1,32
SG 12	30	1,18	1,41	1,19	1,27
	60	1,85	2,64	2,11	1,13
SG 13	30	1,12	1,07	0,88	1,30
	60	-	-	-	1,44
SG 16	30	1,16	1,36	1,13	1,36
	60	1,09	1,25	1,06	1,47
SG 26	30	1,06	1,10	0,85	1,47
	60	1,21	1,12	0,89	1,48
SG 29	30	1,09	1,26	0,98	1,51
	60	1,11	1,36	1,31	1,25
SG 30	30	1,08	1,09	0,88	1,51
	60	1,12	1,12	0,88	1,25
SG 37	30	1,41	-	0,91	-
	60	1,36	-	0,97	-
SG 42	30	1,35	-	-	1,33
	60	-	-	-	1,31

Finalmente a média dos resultados dos experimentos de biodegradação de *n*-alcanos *in vitro* com microrganismos isolados indica que não existe nenhuma preferência pela degradação de *n*-alcanos pares ou ímpares o que é consistente com a biodegradação do petróleo *in vitro* e *in vivo* com consórcios microbianos.

1.1.2 *n*-Alquilcicloexanos

A origem dos *n*-alquilcicloexanos (AC_n) é relatada na literatura como sendo de derivados de bactérias ou da ciclização de ácidos carboxílicos.^{12, 52} E estes foram encontrados na amostra controle desde o *n*-nonilcicloexano até o

⁵² Fabianska, M. J.; Bzowska, G.; Matuszewska, A.; *Chem. Erde.* **2003**, 63, 63-91.

n-eicosilciclohexano, **Tabela 7**, e foram monitorados através do RIC *m/z* 82 e 83, **Figura 15**.

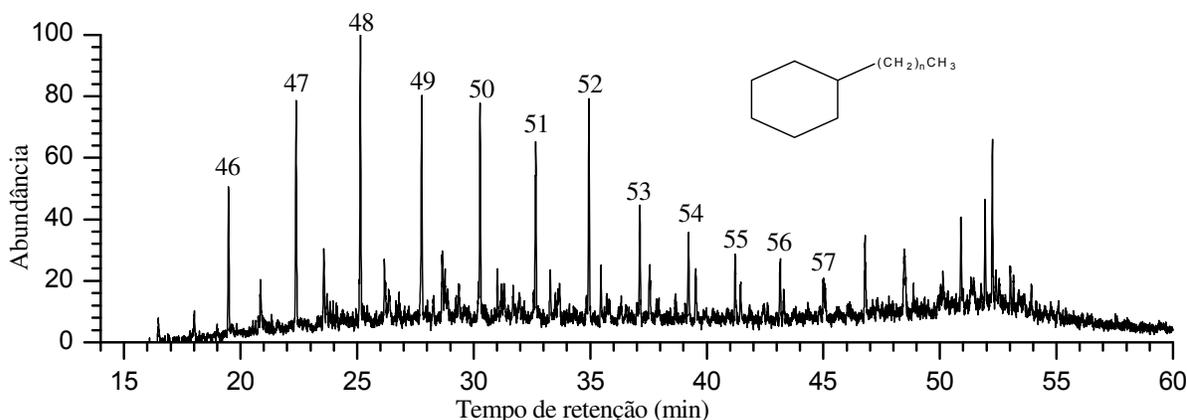


Figura 15 – RIC *m/z* 82 obtido da análise por CG/EM da fração F1 da amostra controle.

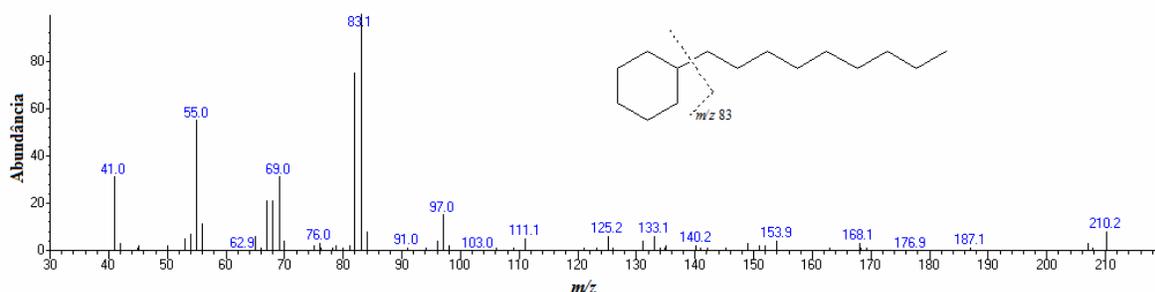


Figura 16 - Espectro de massas do *n*-nonilciclohexano representante da série homóloga alquilcicloexanos.

Tabela 7 – Análise dos alquilcicloexanos através do RIC *m/z* 82.

Composto	Nome	Abrev.	Fórmula	IR	MM
46	<i>n</i> -nonilcicloexano	AC ₁₅	C ₁₅ H ₃₀	1551.758	210
47	<i>n</i> -decilcicloexano	AC ₁₆	C ₁₆ H ₃₂	1655.968	224
48	<i>n</i> -undecilcicloexano	AC ₁₇	C ₁₇ H ₃₄	1760.270	238
49	<i>n</i> -dodecilcicloexano	AC ₁₈	C ₁₈ H ₃₆	1864.366	252
50	<i>n</i> -tridecilcicloexano	AC ₁₉	C ₁₉ H ₃₈	1968.314	266
51	<i>n</i> -tetradecilcicloexano	AC ₂₀	C ₂₀ H ₄₀	2072.482	280
52	<i>n</i> -pentadecilcicloexano	AC ₂₁	C ₂₁ H ₄₂	2176.349	294
53	<i>n</i> -hexadecilcicloexano	AC ₂₂	C ₂₂ H ₄₄	2280.221	308
54	<i>n</i> -heptadecilcicloexano	AC ₂₃	C ₂₃ H ₄₆	2384.427	322
55	<i>n</i> -octadecilcicloexano	AC ₂₄	C ₂₄ H ₄₈	2488.015	336
56	<i>n</i> -nonadecilcicloexano	AC ₂₅	C ₂₅ H ₅₀	2592.258	350
57	<i>n</i> -eicosilcicloexano	AC ₂₆	C ₂₆ H ₅₂	2695.465	364

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

Onde: 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 depois da substância analisada; C_{n-1} = número de átomos de carbono do alcano que elui antes da substância analisada

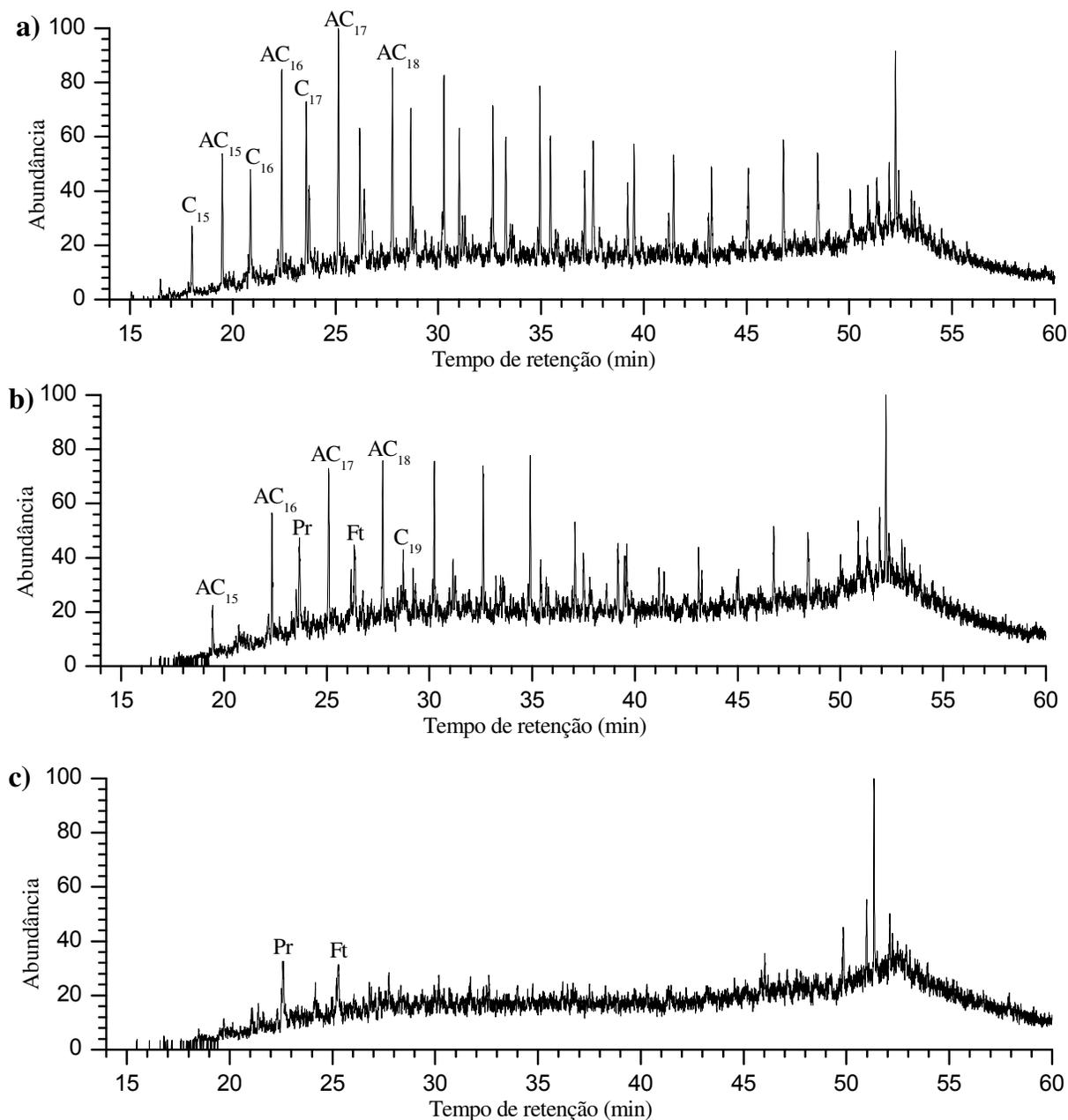


Figura 17 – RIC m/z 83 (*n*-alquilcicloexanos + *n*-alcanos) obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1: **a)** não biodegradado; **b)** biodegradado por *Bacillus pumilus* (SG42-1) 30 dias e **c)** biodegradado por *Bacillus pumilus* (SG42-1) 60 dias.

Esta classe se mostrou susceptível a degradação por alguns dos microrganismos testados (SG 10, 12, 13, 29 e 42) sendo que em alguns casos foram tão biodegradados quanto aos hidrocarbonetos lineares. Ainda

analisando os ensaios foi possível confirmar que os alquilcicloexanos são biodegradados mais intensamente após a remoção dos alcanos lineares (C_n), **Figura 17**.

1.1.3 Aromáticos leves

Os biomarcadores aromáticos fornecem informações a respeito da fonte da matéria orgânica em sedimentos e podem ser usados em correlações de óleo-rocha geradora, além de grau de maturidade e evolução térmica da bacia.⁴

1.1.3.1 Alquil, metil-alkil e trimetil-alkilbenzenos

Os alquilbenzenos (BC_n) foram encontrados desde o *n*-nonilbenzeno até o *n*-eicosilbenzeno, **Tabela 8**, e suas distribuições cromatográficas são similares as dos *n*-alquilcicloexanos possivelmente devido a uma mesma origem biogênica, existem relatos na literatura de que sua origem pode estar relacionada à presença de bactérias na matéria orgânica de origem.⁵³ Também foram detectados os metil-alkilbenzenos (MC_n) desde o metil-octilbenzeno até o metil-heptadecilbenzeno, **Tabela 9**.

⁵³ Fowler, M. G.; Stasiuk, L. D. et al.; *Organic Geochemistry*. **2004**, 35, 425-441.

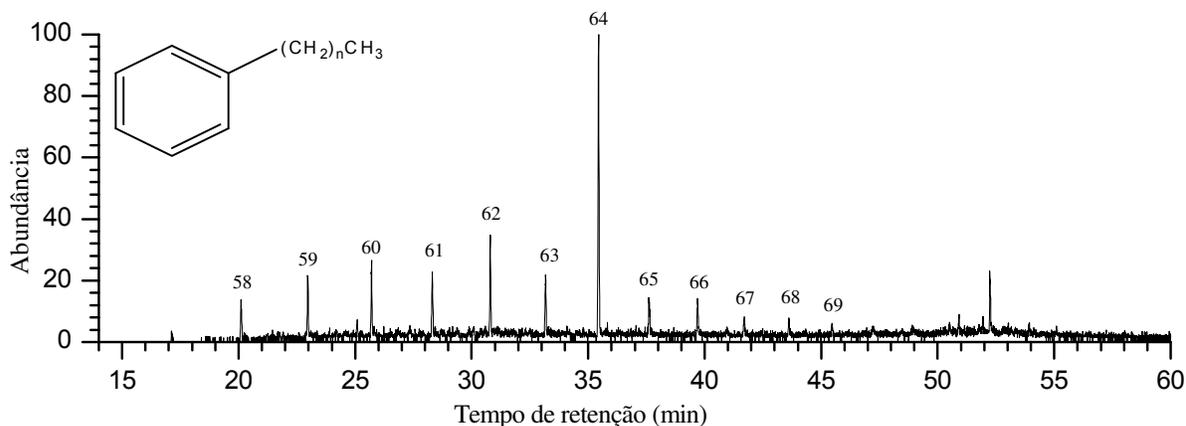


Figura 18 - RIC m/z 92 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.

Tabela 8 – Análise dos alquilbenzenos através do RIC m/z 92.

Composto	Nome	Abrev.	Fórmula	IR	MM
58	n-nonilbenzeno	BC ₁₅	C ₁₅ H ₂₄	1573.629	204
59	n-decilbenzeno	BC ₁₆	C ₁₆ H ₂₆	1677.231	218
60	n-undecilbenzeno	BC ₁₇	C ₁₇ H ₂₈	1781.811	232
61	n-dodecilbenzeno	BC ₁₈	C ₁₈ H ₃₀	1886.239	246
62	n-tridecilbenzeno	BC ₁₉	C ₁₉ H ₃₂	1990.663	260
63	n-tetradecilbenzeno	BC ₂₀	C ₂₀ H ₃₄	2095.274	274
64	n-pentadecilbenzeno	BC ₂₁	C ₂₁ H ₃₆	2199.585	288
65	n-hexadecilbenzeno	BC ₂₂	C ₂₂ H ₃₈	2304.156	302
66	n-heptadecilbenzeno	BC ₂₃	C ₂₃ H ₄₀	2408.286	316
67	n-octadecilbenzeno	BC ₂₄	C ₂₄ H ₄₂	2513.969	330
68	n-nonadecilbenzeno	BC ₂₅	C ₂₅ H ₄₄	2617.357	344
69	n-eicosilbenzeno	BC ₂₆	C ₂₆ H ₄₈	2722.054	358

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

Onde: Ts = tempo de retenção da substância analisada; TC_{n-1} = tempo de retenção do alcano que elui antes da substância analisada; TC_n = tem de retenção do alcano que elui depois da substância analisada; C_{n-1} = número de átomos de carbono do alcano que elui antes da substância analisada

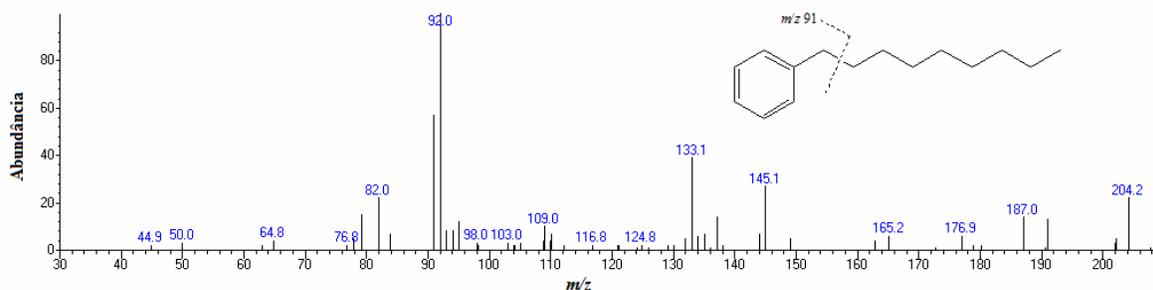


Figura 19 – Espectro de massas do n-nonilbenzeno representante da série homóloga dos alquilbenzenos.

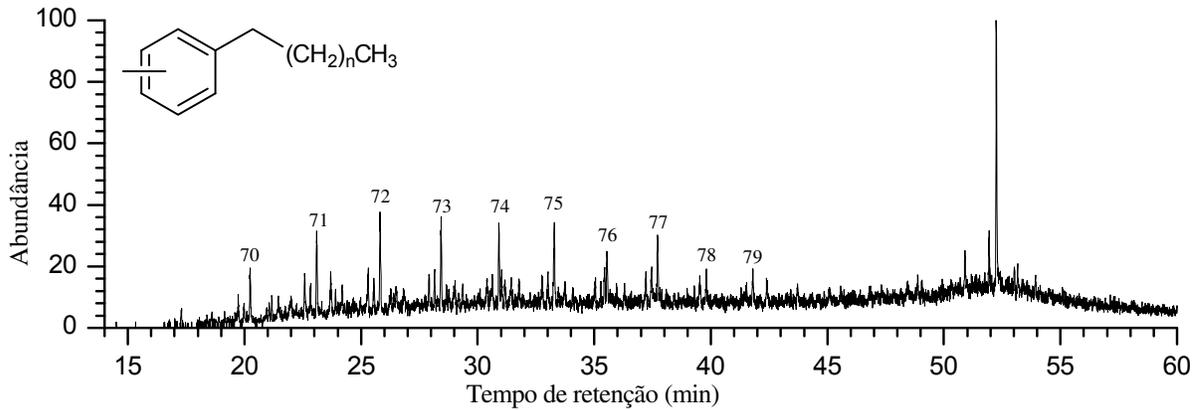


Figura 20 - RIC m/z 105 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.

Tabela 9 – Análise dos metil-alkilbenzenos através do RIC m/z 105.

Composto	Nome	Abrev.	Fórmula	IR	MM
70	metil-octilbenzeno	MC ₁₅	C ₁₅ H ₂₄	1578.446	204
71	metil-nonilbenzeno	MC ₁₆	C ₁₆ H ₂₆	1682.079	218
72	metil-decilbenzeno	MC ₁₇	C ₁₇ H ₂₈	1786.513	232
73	metil-undecilbenzeno	MC ₁₈	C ₁₈ H ₃₀	1891.041	246
74	metil-dodecilbenzeno	MC ₁₉	C ₁₉ H ₃₂	1995.268	260
75	metil-tridecilbenzeno	MC ₂₀	C ₂₀ H ₃₄	2100.184	274
76	metil-tetradecilbenzeno	MC ₂₁	C ₂₁ H ₃₆	2205.005	288
77	metil-pentadecilbenzeno	MC ₂₂	C ₂₂ H ₃₈	2309.664	302
78	metil-hexadecilbenzeno	MC ₂₃	C ₂₃ H ₄₀	2414.487	316
79	metil-heptadecilbenzeno	MC ₂₄	C ₂₄ H ₄₂	2519.491	330

Onde: Ts = tempo de retenção da substância analisada;
 TC_{n-1} = tempo de retenção do alcano que elui antes da substância analisada; TC_n = tem de retenção do alcano que elui depois da substância analisada; C_{n-1} = número de átomos de carbono do alcano que elui antes da substância analisada

$$IR = \left[\left(\frac{Ts - TC_{n-1}}{TC_n - TC_{n-1}} \right) \times 100 \right] + 100 \times C_{n-1}$$

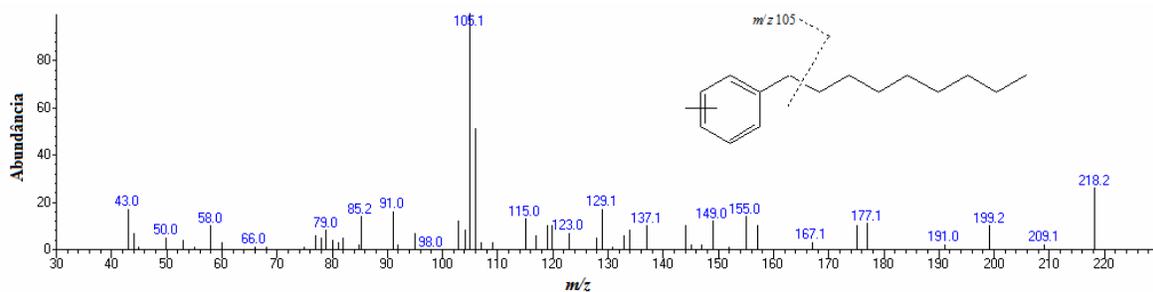


Figura 21 – Espectro de massas do metil-nonilbenzeno representante da série homóloga dos metil-alkilbenzenos.

A classe dos alquilbenzenos e dos metil-alquilbenzenos também se mostrou passível de biodegradação por alguns dos microrganismos (SG 10, 12, 13, 29 e 42), e esta ocorria em conjunto com a dos *n*-alcanos. Sendo que em um caso (SG 13) os alquilbenzenos foram totalmente consumidos antes dos *n*-alcanos, porém não se pode dizer que foi devido a uma preferência por estes compostos já que ambos foram biodegradados simultaneamente e os alquilbenzenos se apresentam em menor quantidade que os *n*-alcanos.

Outra classe encontrada foi os trimetil-alquilbenzenos, detectados através do monitoramento do *m/z* 133. Esta classe pode estar relacionada a contribuições de comunidades bacterianas da família das *Chlorobiaceae*, que são sulfobacterias verdes anaeróbicas reportadas de ocorrerem em mares antigos que possuem alguns carotenóides aromáticos que podem ser precursores dos 1-alkil-2,3,6-trimetilbenzenos encontrados.^{54, 59} E em nossos ensaios também se observou a biodegradação dessa classe em menor proporção quando comparada aos metil-alquilbenzenos.

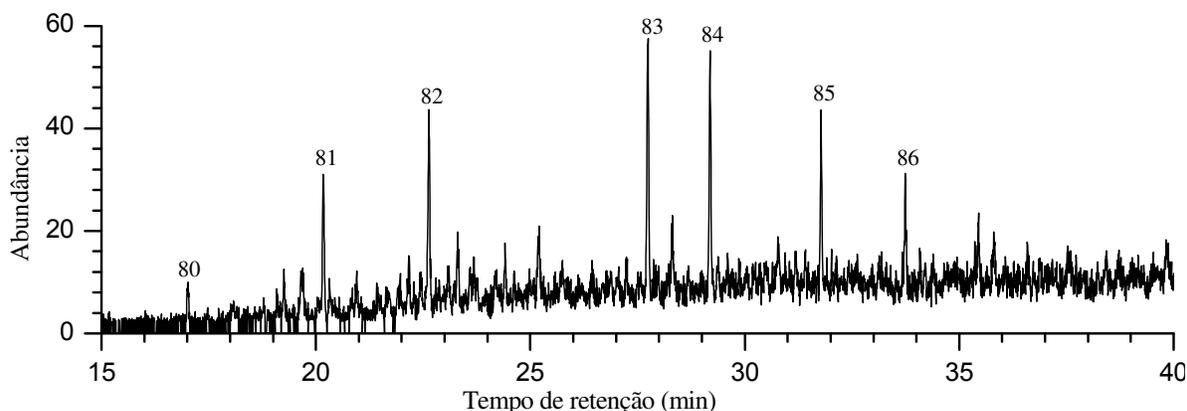


Figura 22 - RIC *m/z* 133 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.

⁵⁴ Xinke, Y.; Pu, F.; Philip, R. P.; *Organic Geochemistry*. **1990**, 15 (4), 433-438.

Tabela 10 - Análise dos trimetil-alkuilbenzenos através do RIC m/z 133.

Composto	Nome	Abrev.	Fórmula	IR	MM
80	1-pentil-2,3,6-trimetilbenzeno	TB ₁₄	C ₁₄ H ₂₂	-	190
81	1-hexil-2,3,6-trimetilbenzeno	TB ₁₅	C ₁₅ H ₂₄	1575.809	204
82	1-heptil-2,3,6-trimetilbenzeno	TB ₁₆	C ₁₆ H ₂₆	1665.222	218
83	1-nonil-2,3,6-trimetilbenzeno	TB ₁₈	C ₁₈ H ₃₀	1863.075	246
84	1-decil-2,3,6-trimetilbenzeno	TB ₁₉	C ₁₉ H ₃₂	1922.602	260
85	1-undecil-2,3,6-trimetilbenzeno	TB ₂₀	C ₂₀ H ₃₄	2033.436	274
86	1-dodecil-2,3,6-trimetilbenzeno	TB ₂₁	C ₂₁ H ₃₆	2120.977	288

Onde: Ts = 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 depois da substância analisada; C_{n-1} = número de átomos de carbono do alcano que elui antes da substância analisada

$$IR = \left[\left(\frac{Ts - TC_{n-1}}{TC_n - TC_{n-1}} \right) \times 100 \right] + 100 \times C_{n-1}$$

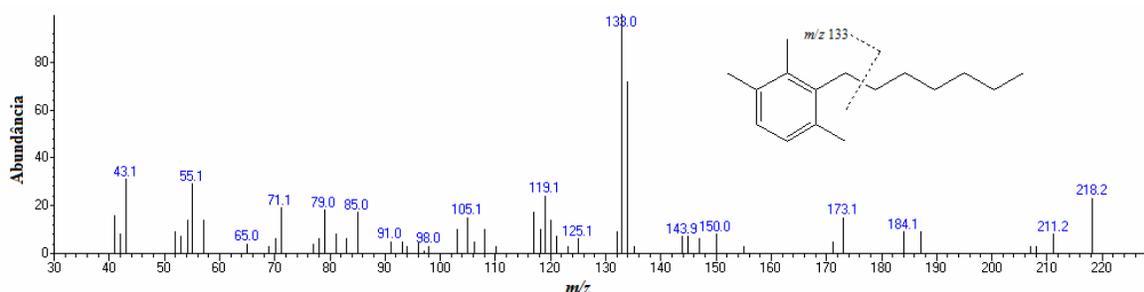


Figura 23 - Espectro de massas do 1-heptil-2,3,6-trimetilbenzeno representante da série homóloga dos trimetil-alkuilbenzenos.

1.1.3.2 Alquilnaftênicos, trimetil e tetrametilnaftênicos

A classe dos naftalenos e seus derivados também é muito pouco estudada, mas estes podem ser usados como indicadores do nível de biodegradação dos óleos. Em nossa amostra encontramos alguns representantes dessa classe, que foram degradados por alguns microrganismos durante o processo de degradação.

Os alquilnaftênicos,

Figura 24, encontrados na amostra de óleo encontram-se na **Tabela 11** com um destaque para o 1-naftil-undecano que foi encontrado em maior quantidade que os demais. Estes foram levemente degradados pelos *Bacillus*

pumilus SG 16 e 26 e severamente degradados pelos SG 13 e 29, mas se mostraram mais resistentes que os alcanos lineares para todos os ensaios.

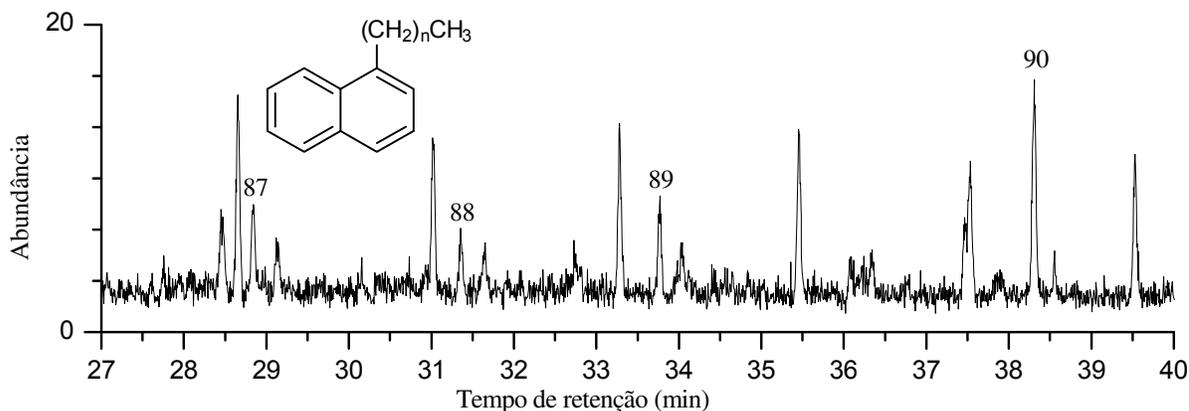


Figura 24 - RIC m/z 141 obtido da análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.

Tabela 11 - Análise dos alquilnaftênicos através do RIC m/z 141.

Composto	Nome	Abrev.	Fórmula	IR	MM
87	1-naftil-heptano	AN ₁₇	C ₁₇ H ₂₂	1907.9	226
88	1-naftil-octano	AN ₁₈	C ₁₈ H ₂₄	2014.664	240
89	1-naftil-nonano	AN ₁₉	C ₁₉ H ₂₆	2122.361	254
90	1-naftil-undecano	AN ₂₁	C ₂₁ H ₃₀	2338.758	282

Onde: 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 depois da substância analisada; C_{n-1} = número de átomos de carbono do alcano que elui antes da substância analisada

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

Na **Figura 25** podemos ver o espectro de massas característico dessa classe para um dos compostos encontrados (**90**).

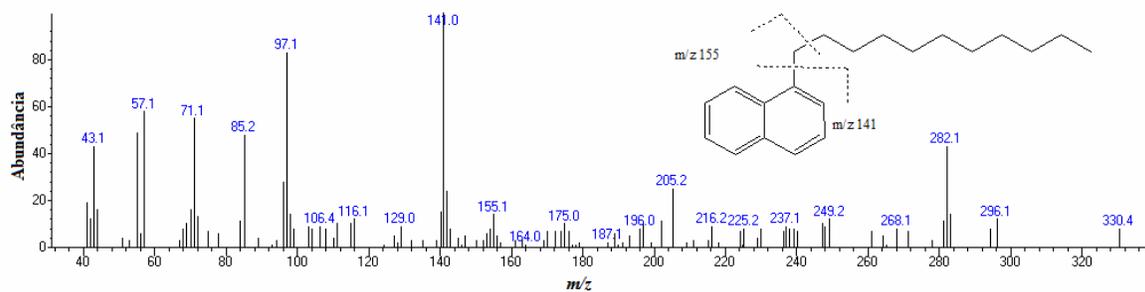


Figura 25 - Espectro de massas do 1-naftil-undecano representante da série homóloga dos alquilnaftênicos.

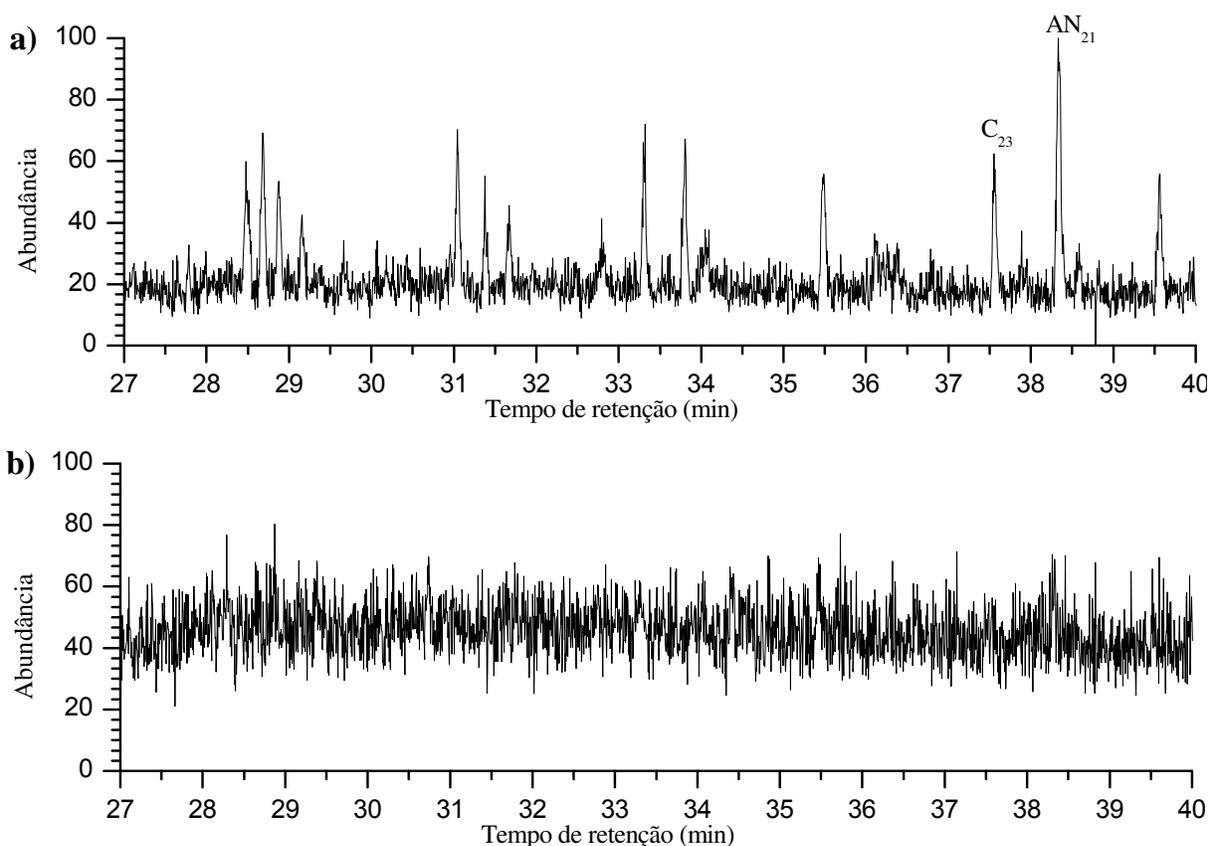


Figura 26 - RIC m/z 141 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1: **a)** biodegradado por *Bacillus pumilus* (SG29) 30 dias e **b)** biodegradado por *Bacillus pumilus* (SG29) 60 dias.

Outros derivados naftênicos encontrados foram os trimetilnaftênicos (TriMN) e os tetrametilnaftênicos (TeMN), **Figura 27**, estes também foram biodegradados, de moderado a severo, pela maioria dos microrganismos sendo que alguns (SG 12, 29, 30, 37 e 42) biodegradaram preferencialmente os

TriMN e os demais (SG 13 e 26) biodegradaram ambas as classes de maneira uniforme, **Figura 28**.

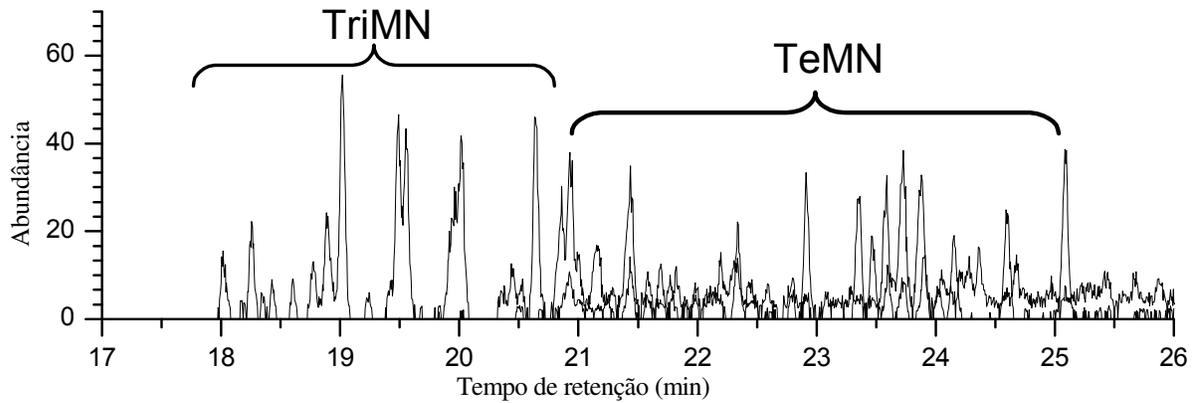


Figura 27 - RIC m/z 155 (trimetilnaftênicos) + m/z 184 (tetrametilnaftênicos) obtido da análise por CG/EM da fração F1 da amostra controle.

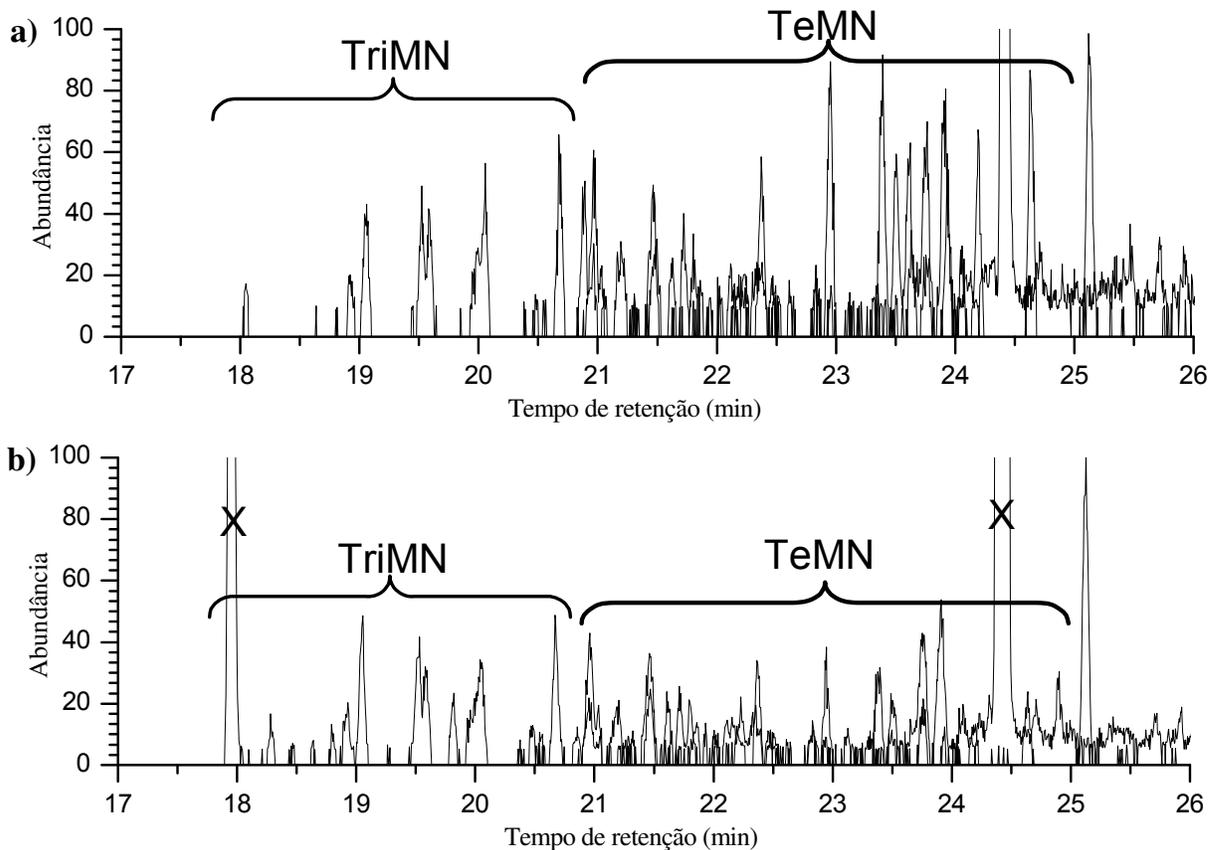


Figura 28 - RIC m/z 155 (trimetilnaftênicos) + m/z 184 (tetrametilnaftênicos) obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1: **a)** biodegradado por *Bacillus pumilus* (SG13) 30 dias e **b)** biodegradado por *Bacillus pumilus* (SG13) 60 dias.

Estes não puderam ser identificados individualmente devido à grande semelhança entre os espectros de massas de cada isômero e a pequena quantidade desses compostos nas amostras estudadas. Mas foram facilmente identificados como classes.

1.1.3.3 Fenantrenos, metil e dimetilfenantrenos

O fenantreno (F) (m/z 178) e os metilfenantrenos (MF) (m/z 192, 191), apesar de não serem considerados biomarcadores, são algumas vezes usados no cálculo de parâmetros de maturidade da rocha geradora. No total existem cinco possíveis isômeros para o metilfenantreno estes são o 1, 2, 3, 4 e 9 – metilfenantreno, **Figura 29**, as demais substituições simplesmente repetem uma dessas cinco.

Desses o 4-metilfenantreno é o menos abundante de todos e quando presente representa menos de 1% de todos os MFs e por isso não é considerado. O índice MPI-1, inicialmente desenvolvido para o estudo de carvão, é o mais aplicado para esse fim.⁵⁵ Estes por sua vez também foram encontrados na nossa amostra de óleo, **Figura 30**.

⁵⁵ Killops, S. D.; Killops, V. J.; In: *An Introduction to Organic Geochemistry*. **1993**, Longman Scientific & Technical, New York.

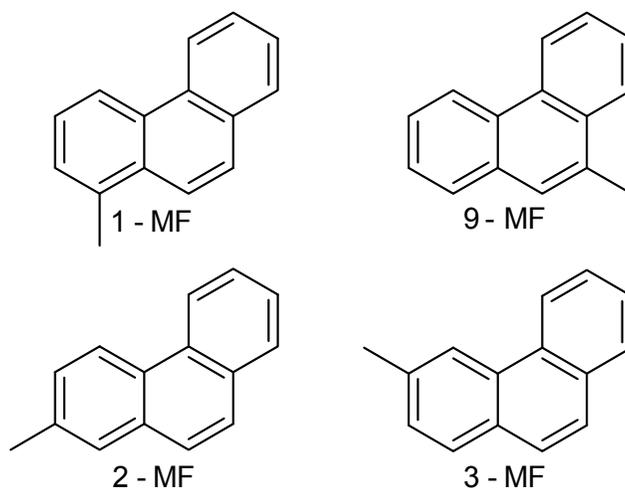


Figura 29 – Representação esquemática dos metil-fenantrenos mais encontrados em amostras de petróleo.

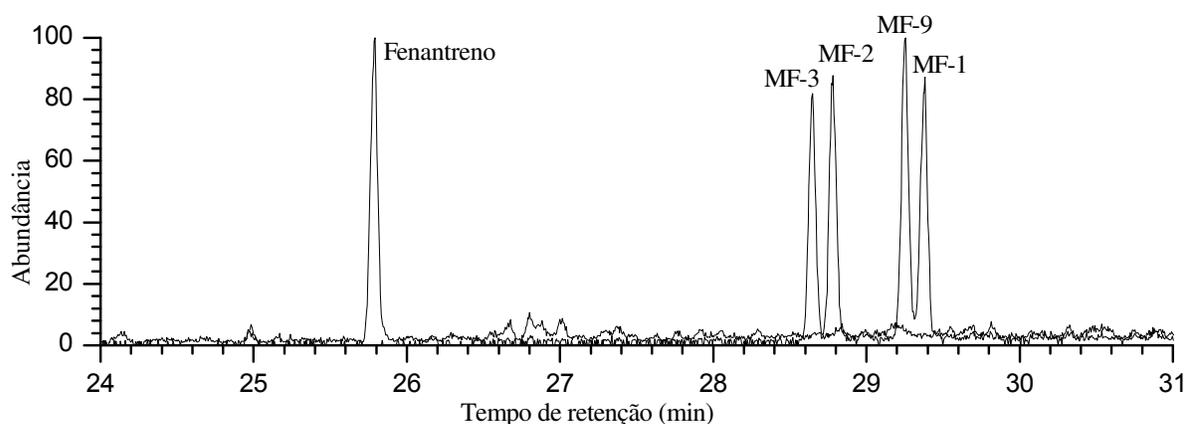


Figura 30 – RIC m/z 178 (F) + m/z 192 (MFs) obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.

Os 1-MF e 9-MF possuem interações estéreas maiores que os 2-MF e 3-MF sendo assim os primeiros são termodinamicamente menos estáveis que os demais. E o que ocorre é que durante a catagênese, quando há o aumento da temperatura, os grupos metilas podem se rearranjar para as posições mais estáveis ocasionando um decréscimo dos 1 e 9 MF e acréscimo dos 2 e 3 MF.

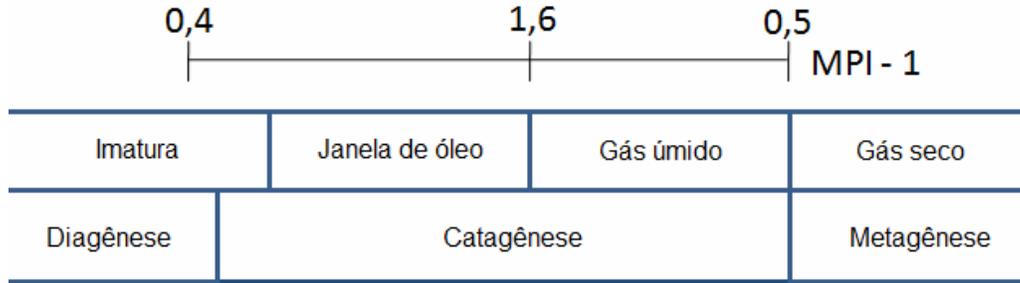


Figura 31 – Correlação entre o índice MPI – 1 com os estágios da geração do petróleo. Adaptado de Killops e Killops.⁵⁵

Contudo esses compostos apesar de serem considerados resistentes a biodegradação em nossos ensaios pode-se observar que estes eram biodegradados. O que novamente deve ser levado em consideração na hora de classificar a maturidade da rocha geradora por meio destes. Por exemplo, em nossos ensaios encontramos microrganismos que no decorrer da biodegradação elevaram o índice MPI -1 enquanto que em outros esse índice diminuiu, **Tabela 12**, e em um caso (SG 13) os MF foram completamente consumidos após 60 dias de ensaio, **Figura 33**.

Tabela 12 – Índice MPI – 1 das amostras de petróleo após processo de biodegradação.

Amostra	MPI – 1*		Amostra	MPI – 1*	
	30 dias	60 dias		30 dias	60 dias
Controle	0,77	0,78	SG10	0,77	0,74
SG12	0,73	0,67	SG13	0,83	-
SG16	0,78	0,78	SG26	0,59	0,73
SG29	0,77	0,74	SG30	0,76	0,82
SG37	0,75	0,72	SG42	0,76	0,74

*MPI – 1 = 1,5x{[(2-MF)+(3-MF)]/[(F)+(1-MF)+(9-MF)]}

Outra classe avaliada foram os dimetil-fenantrenos, **Figura 32**, estes também se mostraram suscetíveis a biodegradação e em alguns casos foram

totalmente removidos, **Figura 33**, no geral são menos biodegradados em comparação aos metil-fenantrenos, mas como visto não estão imunes à degradação. Para nossos ensaios realizamos o cálculo do índice DMP que é também utilizado para se obter informação da maturidade da rocha geradora e vimos novamente que a biodegradação também está influenciando esse índice,

Tabela 13.

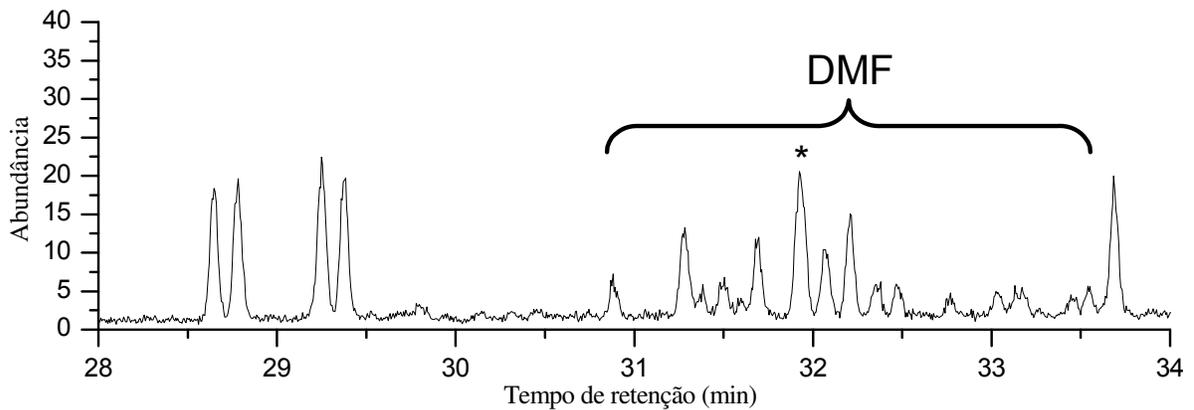


Figura 32 – RIC m/z 191 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.

Tabela 13 - Índice DMP das amostras de petróleo após processo de biodegradação.

Amostra	DMP*		Amostra	DMP*	
	30 dias	60 dias		30 dias	60 dias
Controle	0.73	0.72	SG10	0.71	0.56
SG12	0.71	0.37	SG13	0.71	-
SG16	0.71	0.70	SG26	0.56	0.71
SG29	0.65	0.80	SG30	0.74	0.74
SG37	0.57	0.48	SG42	0.66	0.37

* DMP = Principal pico na classe DMP (*) / [(F) + (Σ MFs)].

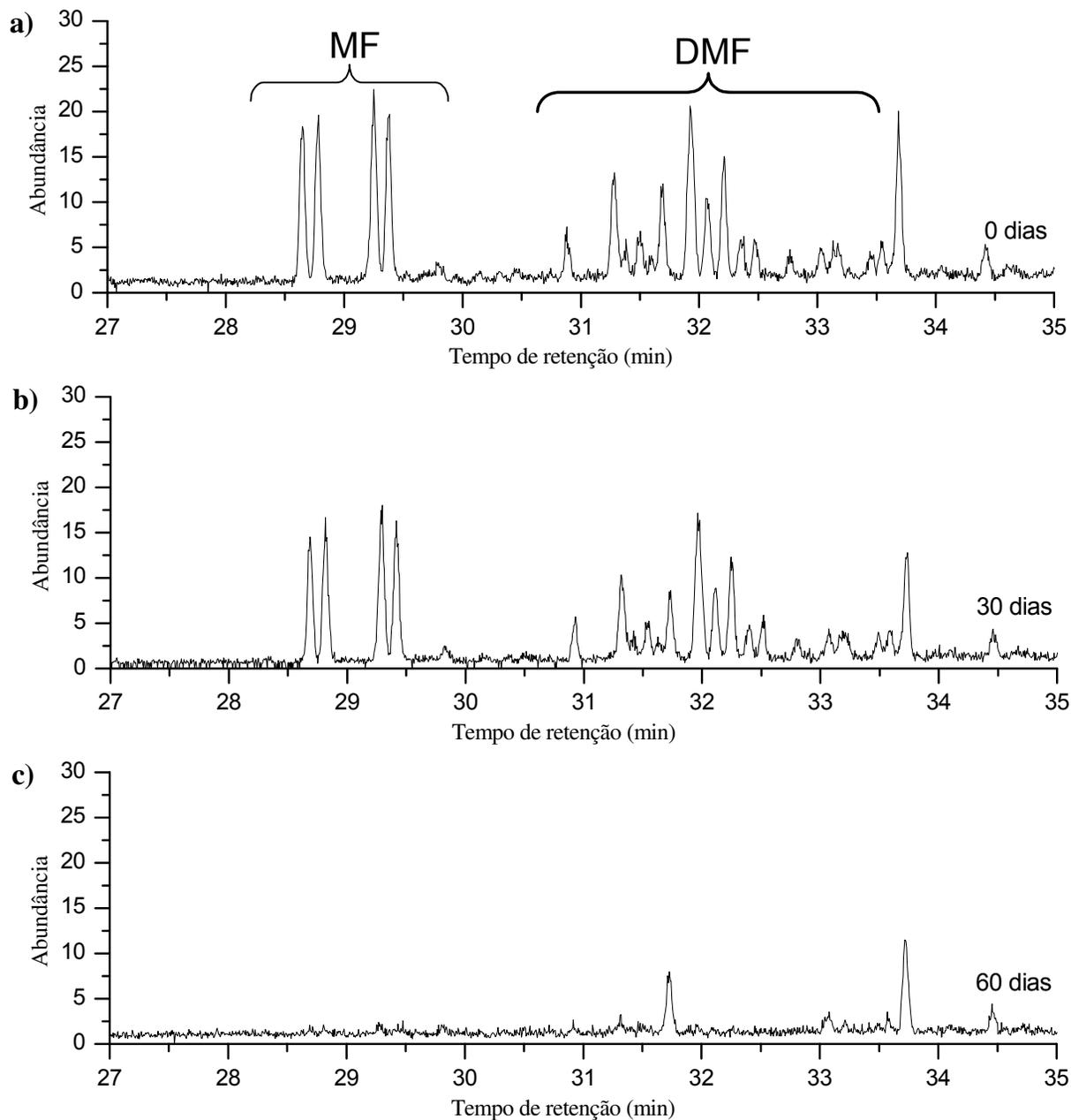


Figura 33 – RIC m/z 191 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1: **a)** Controle não biodegradado; **b)** biodegradado por *Bacillus pumilus* (SG 13) – 30 dias; **c)** biodegradado por *Bacillus pumilus* (SG13) – 60 dias.

1.1.4 Terpanos

1.1.4.1 Sesquiterpanos Bicíclicos

Os sesquiterpanos foram primeiramente reportados em óleos severamente biodegradados do golfo do México.⁵⁶ São comuns nos óleos e betumes e podem ser originários de bactérias ou plantas superiores.⁵⁷ Em nossa amostra de óleo encontramos o 8β(H)-homodrimano (m/z 123), **Figura 34** e **Tabela 14**, composto da classe dos drimanos já descritos em óleos de bacias brasileiras em trabalhos do nosso grupo.^{58, 59} Há relatos também que esses bicíclicos podem ser originados durante a biodegradação⁶⁰ ou da degradação térmica dos terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos.⁶¹ No geral, são menos susceptíveis a biodegradação do que os isoprenóides, mas são removidos antes dos hopanos e esteranos.¹²

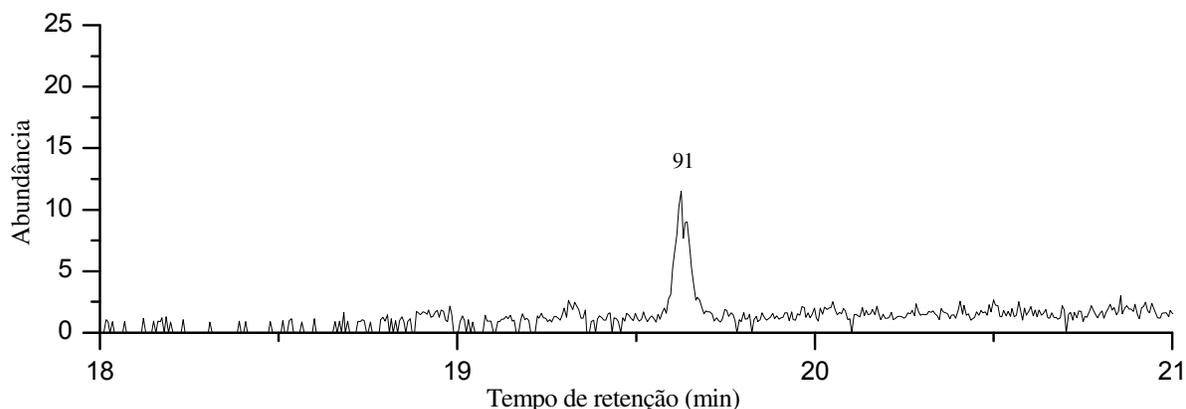


Figura 34 - RIC m/z 123 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle.

⁵⁶ Bendoraitis, J. G.; Hydrocarbons of biogenic origin in petroleum-aromatic triterpenes and bicyclic sesquiterpenes. In: *Advances in Organic Geochemistry*, Editions Technip, Paris (1974), 209–224.

⁵⁷ Brocks, J. J.; Summons, R. E.; *Treatise on Geochemistry*. **2003**, 8, 63-115.

⁵⁸ Borin, J. E.; Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – UNICAMP – Campinas – Brasil. **2003**.

⁵⁹ de Lima, S. G.; Tese de Doutorado – Instituto de Química – UNICAMP – Campinas – Brasil. **2005**.

⁶⁰ Weston, R. J.; Philip, R. P.; Sheppard, C. M.; Woolhouse, A. D. *Organic Geochemistry*. **1989**, 14, 405-421.

⁶¹ Trendel, J. M.; Restlé, A.; Connna, J.; Albrech, P.; *Journal Chemical Society, Chemical Communication*. **1982**, 304-306.

Tabela 14 - Análise dos sesquiterpenos bicíclicos através do RIC m/z 123.

Composto	Nome	Fórmula	IR	MM
91	8 β (H)-homodrimano	C ₁₆ H ₃₀	1556.575	222

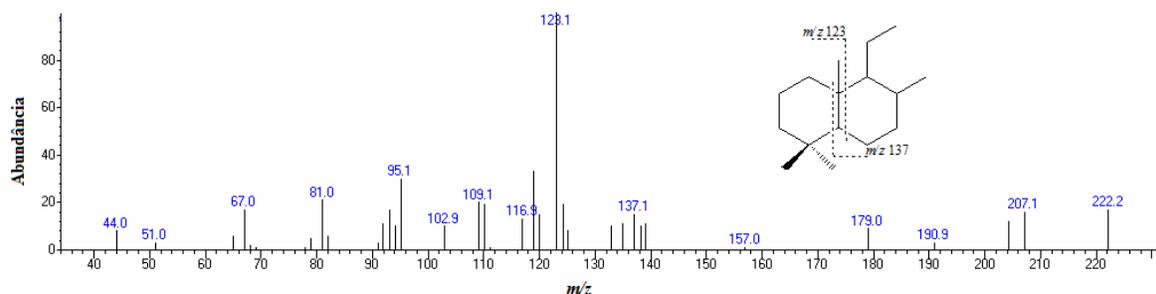


Figura 35 - Espectro de massas do sesquiterpano bicíclico 8 β (H)-homodrimano.

Em nossos ensaios em quase todos os casos houve biodegradação do 8 β (H)-homodrimano (de 2 a 100%). Contudo em alguns casos houve um acréscimo seguido de degradação e em outro (SG 16) houve degradação seguido de aumento, **Figura 36**. Esses resultados indicam que em nossos ensaios está havendo a formação do terpano bicíclico a partir da degradação dos terpanos tricíclicos, tetracíclicos ou pentacíclicos, que ocorre em diferentes momentos para cada microrganismo.³³

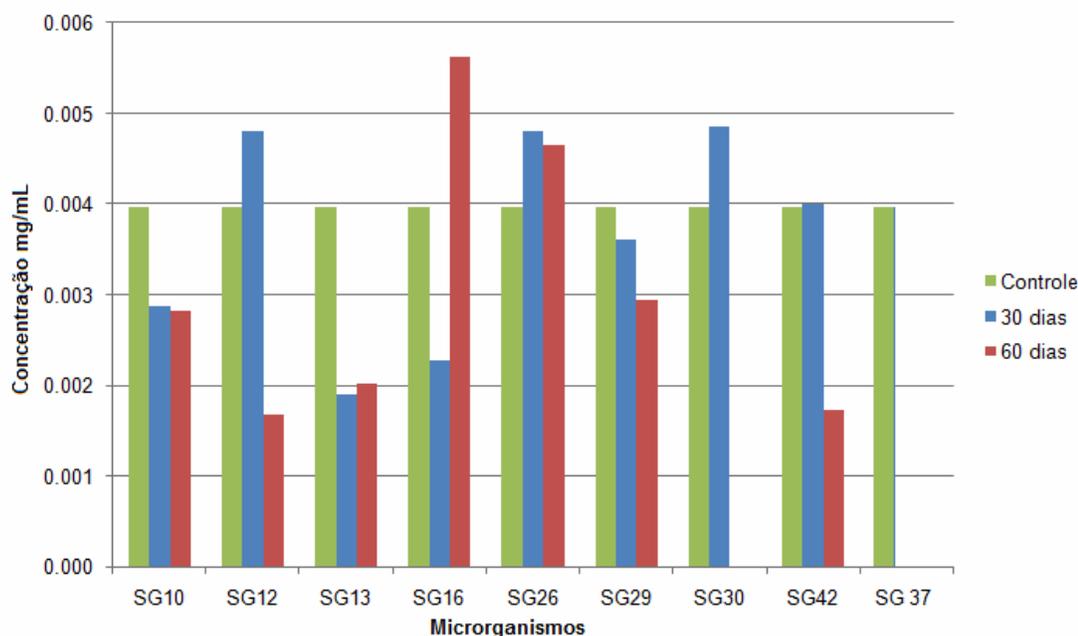


Figura 36 - Acompanhamento da concentração do 8β(H) – homodrimano nos ensaios de biodegradação.

1.1.4.2 Terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos

Os terpanos (m/z 191) são usados como biomarcadores de correlação óleo-óleo, óleo-rocha geradora e como indicador do nível de maturação e biodegradação de óleos.¹² Os tricíclicos têm sua origem proposta da ciclização anaeróbica do hexaprenol que forma o seu precursor direto triciclohexaprenol, **Figura 37**.⁶²



Figura 37 – Terpano tricíclico, formado anaerobicamente a partir da ciclização do hexaprenol.

⁶² Aquino Neto, F. R.; Trendel, J. M.; Restlé, A.; Albrecht, P. A.; *In: Advances on Organic Geochemistry*. 1981, John Wiley & Sons, New York, 659-676.

Os terpanos tetracíclicos são menos abundantes e são gerados da degradação térmica ou microbiana dos terpanos pentacíclicos. Já estes com esqueleto do tipo hopanóide têm como precursor o bacteriohopanotetrol ¹² e sua presença em óleos esta relacionada à contribuição de biomassa proveniente de bactérias metanotróficas, heterotróficas e cianobactérias na diagênese do petróleo. ⁶³ Em nossos ensaios foi possível notar o início da biodegradação tanto dos terpanos tricíclicos quanto dos pentacíclicos.

Em nossa amostra encontramos diversos representantes da classe dos terpanos tricíclicos, **Tabela 15** e **Figura 38**, e pentacíclicos, **Tabela 16** e **Figura 39**, os quais são característicos pelos fragmentos m/z 191 e 123, **Figura 39** e **Figura 1**.

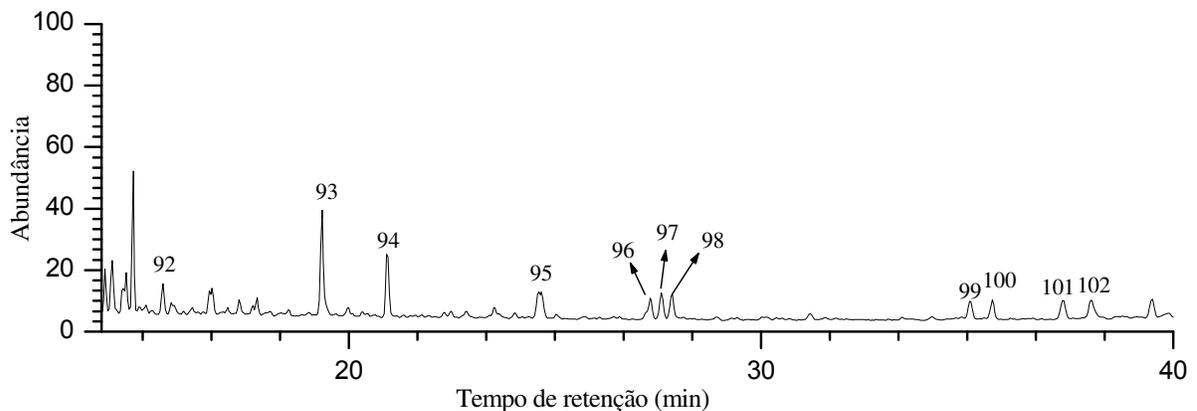


Figura 38 - RIC m/z 191 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 da amostra controle (Terpanos Tricíclicos).

⁶³ Simons, D-J. H.; kenig, F.; *Organic Geochemistry*. **2003**, 34, 1177-1198.

Tabela 15 - Análise dos terpanos tricíclicos e tetracíclicos através do RIC m/z 191.

Composto	Nome	Abrev.	Fórmula	IR	MM
92	Terpano tricíclico C ₂₂	22TT	C ₂₂ H ₄₀	2118.442	304
93	Terpano tricíclico C ₂₃	23TT	C ₂₃ H ₄₂	2301.753	318
94	Terpano tricíclico C ₂₄	24TT	C ₂₄ H ₄₄	2356.234	332
95	Terpano tricíclico C ₂₅	25TT	C ₂₅ H ₄₆	2470.558	346
96	Terpano tetracíclico C ₂₄	24TET	C ₂₄ H ₄₂	2552.084	330
97	Terpano tricíclico C ₂₆ (S)	26TT(S)	C ₂₆ H ₄₈	2555.495	360
98	Terpano tricíclico C ₂₆ (R)	26TT(R)	C ₂₆ H ₄₈	2562.913	360
99	Terpano tricíclico C ₂₈ (S)	28TT(S)	C ₂₈ H ₅₂	2755.426	388
100	Terpano tricíclico C ₂₈ (R)	28TT(R)	C ₂₈ H ₅₂	2769.195	388
101	Terpano tricíclico C ₂₉ (S)	29TT(S)	C ₂₉ H ₅₄	2813.737	402
102	Terpano tricíclico C ₂₉ (R)	29TT(R)	C ₂₉ H ₅₄	2831.434	402

Onde: Ts = 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 depois da substância analisada; C_{n-1} = número de átomos de carbono do alcano que elui antes da substância analisada

$$iR = \left[\left(\frac{Ts - TC_{n-1}}{TC_n - TC_{n-1}} \right) \times 100 \right] + 100 \times C_{n-1}$$

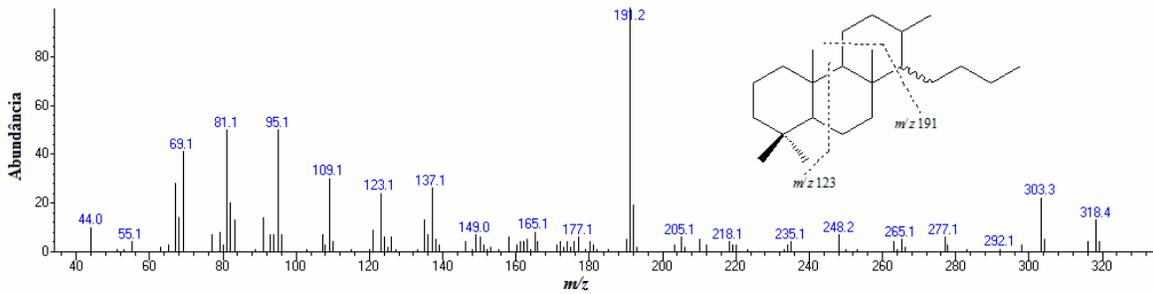


Figura 39 - Espectro de massas do terpano tricíclico C₂₃, representante da classe dos terpanos tricíclicos.

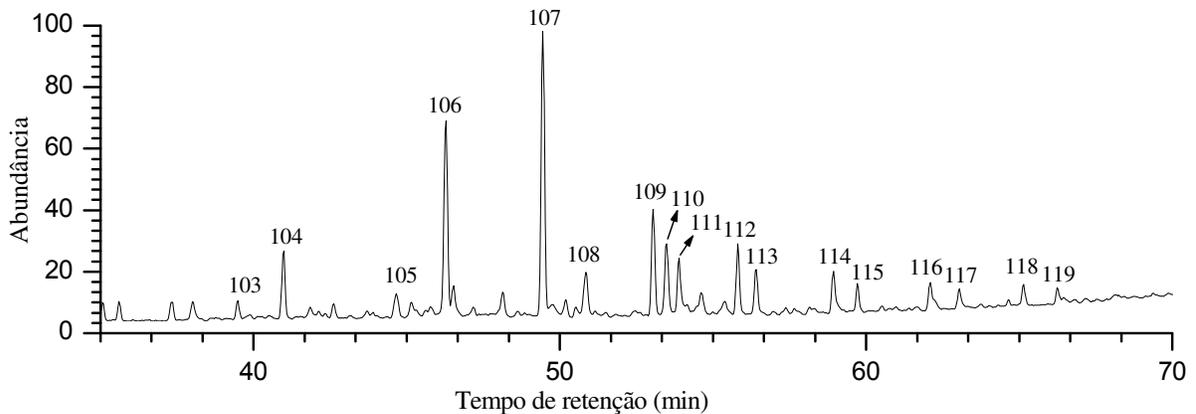


Figura 40 - RIC m/z 191 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo P1 da amostra controle (Homohopanos).

Tabela 16 - Análise dos terpanos pentacíclicos através do RIC m/z 191.

Composto	Nome	Abrev.	Fórmula	IR	MM
103	18 α -22,29,30-Trisnorneohopano	Ts	C ₂₇ H ₄₆	2884.643	370
104	17 α -22,29,30-Trisnorneohopano	Tm	C ₂₇ H ₄₆	2925.772	370
105	17 α ,18 α ,21 β -28,30-Bisnorhopano	28,30BNH	C ₂₈ H ₄₈	3020.840	384
106	17 α ,21 β -30-Norhopano	30NH	C ₂₉ H ₅₀	3066.563	398
107	17 α ,21 β -30-Hopano	30H $\alpha\beta$	C ₃₀ H ₅₂	3156.052	412
108	5 α -Colestan-3-ona (PI)	-	-	-	-
109	17 α ,21 β -Homohopano	31H(S)	C ₃₁ H ₅₄	3261.685	426
110	17 α ,21 β -Homohopano	31H(R)	C ₃₁ H ₅₄	3275.426	426
111	Gamacerano	Gam	C ₃₀ H ₅₂	3296.891	412
112	17 α ,21 β -Bishomohopano	32H(S)	C ₃₂ H ₅₆	3347.689	440
113	17 α ,21 β -Bishomohopano	32H(R)	C ₃₂ H ₅₆	3367.283	440
114	17 α ,21 β -Trishomohopano	33H(S)	C ₃₃ H ₅₈	3448.208	454
115	17 α ,21 β -Trishomohopano	33H(R)	C ₃₃ H ₅₈	3475.081	454
116	17 α ,21 β -Tetrakishomohopano	34H(S)	C ₃₄ H ₆₀	-	468
117	17 α ,21 β -Tetrakishomohopano	34H(R)	C ₃₄ H ₆₀	-	468
118	17 α ,21 β -Pentakishomohopano	35H(S)	C ₃₅ H ₆₂	-	482
119	17 α ,21 β -Pentakishomohopano	35H(R)	C ₃₅ H ₆₂	-	482

Onde: Ts = tempo de retenção da substância analisada; TC_{n-1} = tempo de retenção do alcano que elui antes da substância analisada; TC_n = tem de retenção do alcano que elui depois da substância analisada; C_{n-1} = número de átomos de carbono do alcano que elui antes da substância analisada

$$IR = \left[\left(\frac{Ts - TC_{n-1}}{TC_n - TC_{n-1}} \right) \times 100 \right] + 100 \times C_{n-1}$$

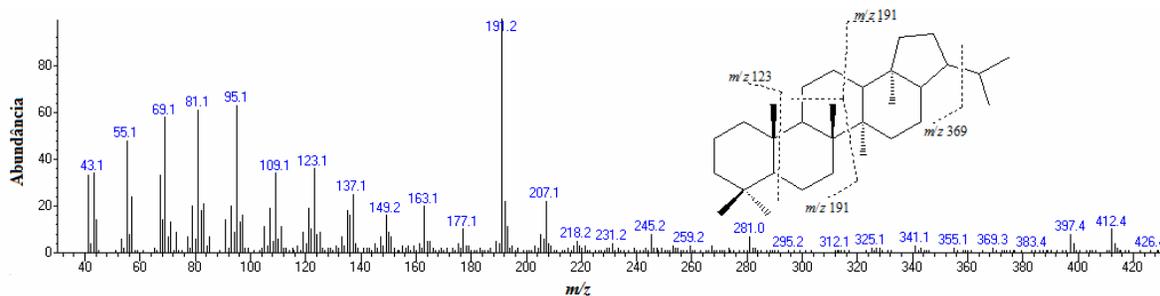


Figura 41 - Espectro de massas do 17 α ,21 β -30-hopano, representante da classe dos terpanos pentacíclicos.

Observando as razões dos TT(C₂₈ e C₂₉)/C₃₅ homohopano, **Tabela 17**, não se pôde tirar nenhuma conclusão a respeito da preferência de degradação entre as duas classes, uma vez que tivemos microrganismos que

biodegradaram preferencialmente os TT (SG 12, 13 e 30) e outros os homohopanos (SG 29, 16 e 26).

Analisando ainda o índice homohopano que é a razão entre o pentakishomohopano (C_{35}) sobre todos homohopanos ($\Sigma C_{31}-C_{35}$) e que está relacionado com o ambiente deposicional da matéria orgânica e maturidade da rocha geradora, nota-se que este também sofre influência da biodegradação. Sendo que na maioria dos casos onde houve biodegradação significativa o índice inicialmente sofre um incremento seguido de um decréscimo, mas ficando ainda maior do que o controle, **Figura 42** e **Tabela 17**, possivelmente pela biodegradação dos $C_{33}-C_{34}$ homohopanos estar ocorrendo anteriormente a do C_{35} (R e S) homohopano. Com isso, a obtenção de informações do ambiente deposicional (óxico ou anóxico) através desse parâmetro não é possível sem entender o processo de biodegradação do óleo em questão.

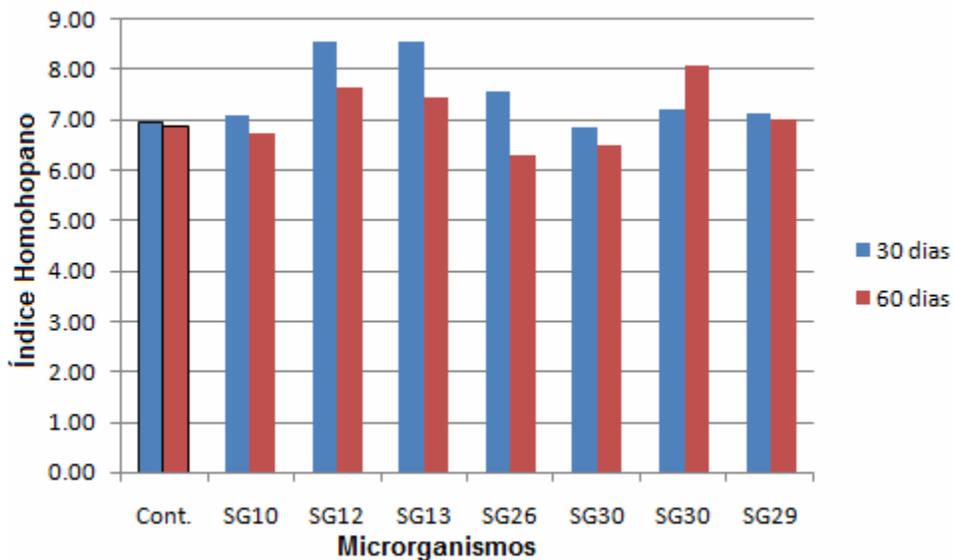


Figura 42 - Índice homohopano calculado para os ensaios de biodegradação.

Ainda analisando os C_{25} , C_{30} , $C_{28, 30}$ e $C_{25, 28, 30}$ hopanos desmetilados (norhopanos), estes não apresentaram nenhum incremento ou biodegradação muito significativa durante o período avaliado, quando comparados com o C_{30}

hopano, apesar da degradação inicial dos pentacíclicos hopanóides. O que pode ser comprovado pelo índice 25-norhopano (25-NH), **Tabela 17**, que teve pequenos aumentos para alguns microrganismos com o decorrer da biodegradação, mas não foram tão significativos. O que reforça a hipótese de que parte da degradação dos homohopanos esteja dando origem aos sesquiterpanos bicíclicos.

Tabela 17 – Parâmetros de correlação da classe dos terpanos calculados para os ensaios de biodegradação.

Microrganismo	Razões	Período (dias)		Microrganismo	Razões	Período (dias)	
		30	60			30	60
Controle	C28TT/C35H^a	1.1	1.1	SG 10	C28TT/C35H	1.1	1.1
	C29TT/C35H^a	1.5	1.5		C29TT/C35H	1.4	1.3
	Ts/Tm^b	0.3	0.3		Ts/Tm	0.3	0.3
	Ho-Ho^c	6.9	6.8		Ho-Ho	7.1	6.7
	25-NH^d	2.3	2.4		25-NH	2.5	2.5
SG 12	C28TT/C35H	0.9	0.9	SG 13	C28TT/C35H	0.8	0.8
	C29TT/C35H	1.2	1.3		C29TT/C35H	0.9	1.1
	Ts/Tm	0.3	0.3		Ts/Tm	0.3	0.3
	Ho-Ho	8.6	7.6		Ho-Ho	8.6	7.5
	25-NH	2.5	2.2		25-NH	2.4	2.3
SG 16	C28TT/C35H	1.1	1.3	SG 26	C28TT/C35H	1.2	1.3
	C29TT/C35H	1.3	1.6		C29TT/C35H	1.3	1.5
	Ts/Tm	0.3	0.3		Ts/Tm	0.3	0.3
	Ho-Ho	7.6	6.3		Ho-Ho	6.9	6.5
	25-NH	2.4	2.5		25-NH	2.4	2.4
SG 29	C28TT/C35H	1.2	0.9	SG 30	C28TT/C35H	1.0	1.0
	C29TT/C35H	1.5	1.2		C29TT/C35H	1.3	1.5
	Ts/Tm	0.3	0.3		Ts/Tm	0.3	0.3
	Ho-Ho	7.2	8.1		Ho-Ho	7.2	7.0
	25-NH	2.5	2.3		25-NH	2.3	2.3

Calculado a partir das áreas obtidas do RIC m/z 191; ^a dos C₂₈-C₂₉ terpano tricíclico (TT) (22S+22R), C₃₅ 17 α ,21 β (H)-homohopano (C35H) (22R+ 22S); ^b dos C₂₇ 17 α (H),22,29,30-trisnorhopano (Tm) e C₂₇ 18 α (H)-22,29,30-trisnorneohopano(Ts); ^c [C₃₅ (22R+22S)/(C₃₁-C₃₅)(22R+22S)Homohopanos]x100; ^d calculado a partir do RIC m/z 177 do 25-norhopano (25-NH)/ Σ C₃₀-C₃₅ hopanos (m/z 191) + 25-NH]x100.

1.2 Consórcios microbianos recuperados do Campo Pintassilgo, Bacia Potiguar

Os diferentes consórcios obtidos para cada meio de cultivo utilizado na recuperação da microbiota da amostra de óleo PS1 foram reunidos em um único consórcio. O qual foi utilizado para realização de ensaios de biodegradação utilizando o óleo PS1, previamente esterilizada, como principal fonte de carbono. Ensaios estes realizados em duplicata com monitoramento em intervalos de 10 dias durante 60 dias através de extrações totais com CH_2Cl_2 . Todos os experimentos foram montados com os microrganismos ainda em fase *log* de crescimento.

Os extratos orgânicos evaporados foram então fracionados em coluna de sílica gel e obtiveram-se três frações F1 (saturados), F2 (aromáticos pesados) e F3 (asfaltenos). As frações F1 foram então analisadas por CG/EM onde foi possível acompanhar o processo de biodegradação ocorrido nas classes de compostos abaixo listados:

- n-Alcanos (parafinas normais) e isoprenóides (isoparafinas);
- Terpanos tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos (hopanos e norhopanos);
- Alquilcicloexanos.
- Fenantrenos e alquilfenantrenos e alquilnaftalenos.

1.2.1 n-Alcanos e isoprenóides

Com estes ensaios podemos perceber que o reservatório em estudo, da Bacia Potiguar, apesar de *in situ* não ser biodegradado já apresenta microrganismos capazes de biodegradar pelo menos os hidrocarbonetos de menor peso molecular, **Figura 43**.

Ainda comparando esses dados com trabalhos anteriores, onde utilizou-se uma microbiota recuperada de amostras de óleos mais biodegradadas, pôde-se perceber que os microrganismos recuperados de amostras de óleos ainda não biodegradadas foram menos eficientes na degradação do óleo quando comparados aos recuperados de amostras mais biodegradadas (Co2).

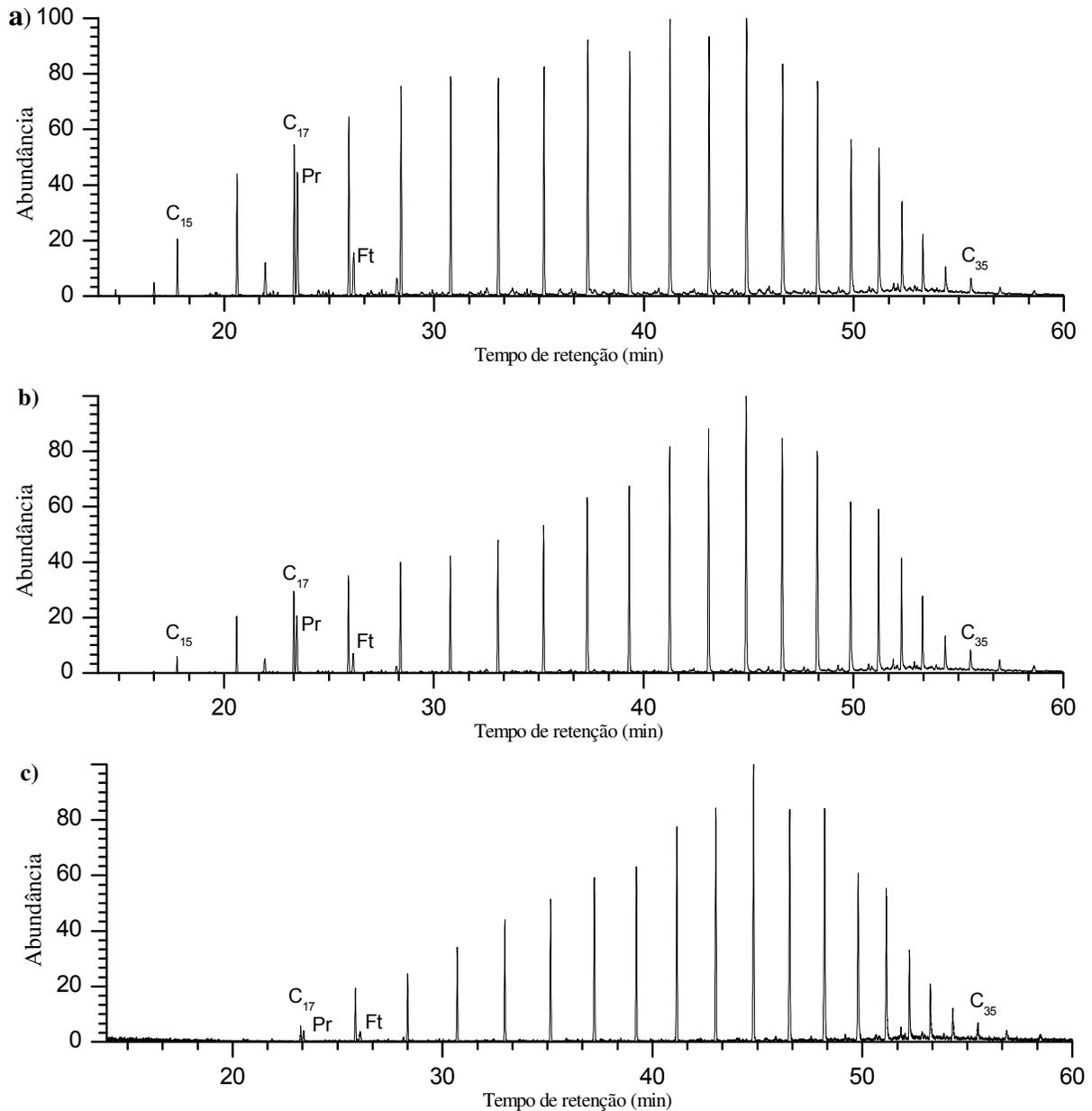


Figura 43 – RIC m/z 71 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo PS1 biodegradadas pelo consórcio microbiano CON1. **a)** 10 dias; **b)** 30 dias e **c)** 60 dias.

Tabela 18 - Parâmetros de biodegradação para os ensaios com o CON1.

Período (dias)	Parâmetro			
	IPC	Pr/n-C17	Ph/n-C18	Pr/Ph
10	1.10	0.88	0.31	2.56
20	1.11	0.83	0.30	2.53
30	1.07	0.74	0.27	2.38
40	1.11	0.97	0.30	2.10
50	1.13	0.98	0.29	2.08
60	1.11	0.89	0.28	1.95

Analisando ainda alguns parâmetros dessa classe pôde-se perceber que o índice de preferência de carbono permaneceu quase que inalterado não mostrando nenhuma preferência dessas microbiotas em degradar hidrocarbonetos pares ou ímpares, **Tabela 18**.

Já nos trinta primeiros dias foi possível perceber uma maior preferência em degradar os hidrocarbonetos lineares com relação aos isoprenóides o que foi invertido após esse período. E novamente o isoprenóide mais biodegradado foi o pristano, **Tabela 18**.

1.2.2 *n*-Alquilcicloexanos

Encontramos também na amostra PS1 a série dos *n*-alquilcicloexanos e estes foram totalmente degradados pelo CON1 concomitante com a degradação dos hidrocarbonetos lineares mais leves, **Figura 44**.

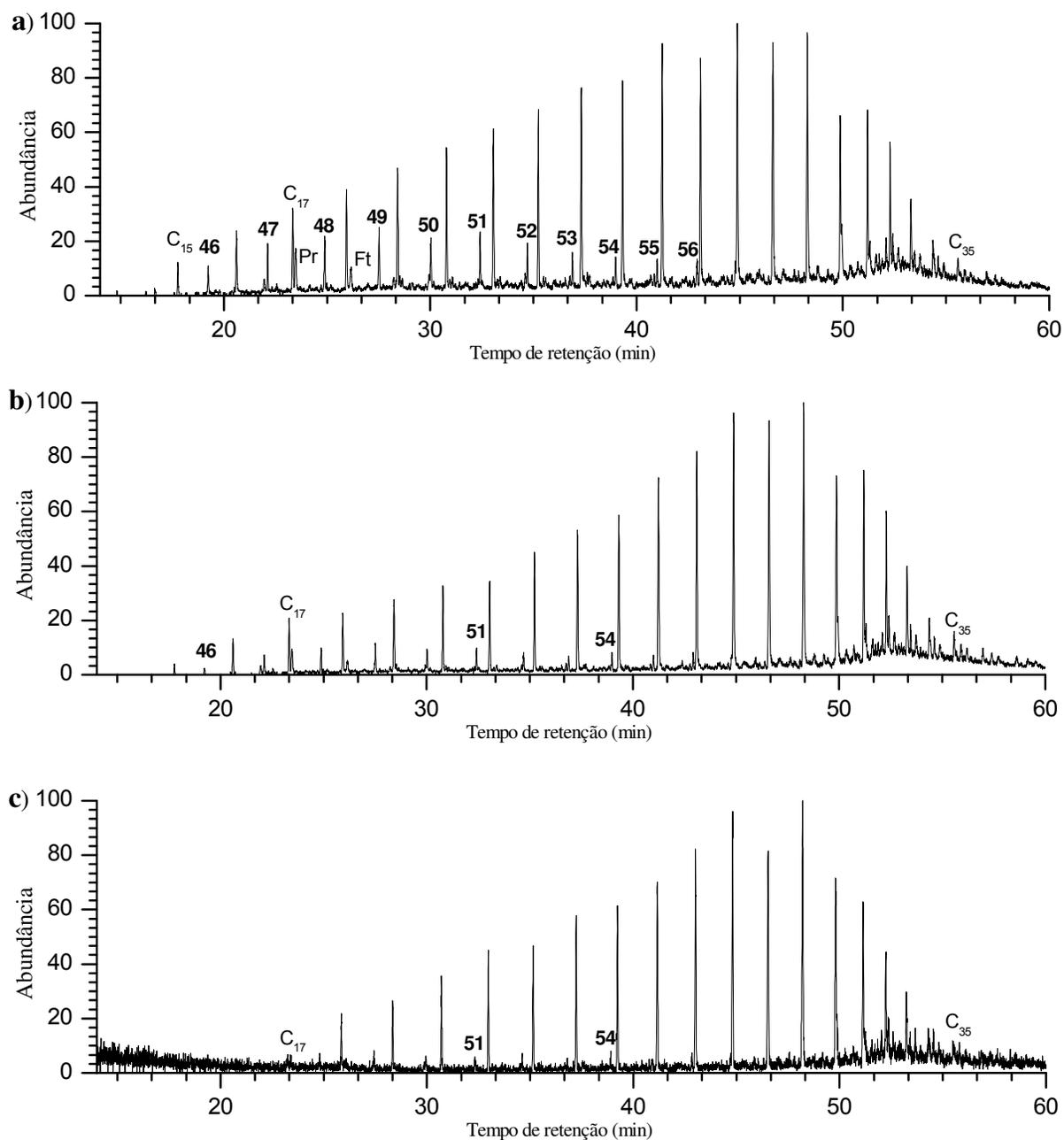


Figura 44 - RIC m/z 83 (*n*-Alquilcicloexanos + *n*-alcanos) obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo PS 1 biodegradadas pelo consórcio microbiano CON1. **a)** 10 dias; **b)** 30 dias; **c)** 60 dias.

1.2.3 Fenantrenos, metil e dimetilfenantrenos

O fenantreno e os metilfenantrenos também foram encontrados na amostra PS1 e novamente foram removidos, agora antes mesmo da remoção total dos hidrocarbonetos lineares, **Figura 45**. O que mostra de novo que esta classe também está susceptível a degradação microbiana.

O mesmo também foi observado para os dimetilfenantrenos e tri e tetrametilnaftalenos que apesar de não terem sido identificados individualmente pôde-se visualizar que estas classes foram praticamente removidas por completo (dados não mostrados).

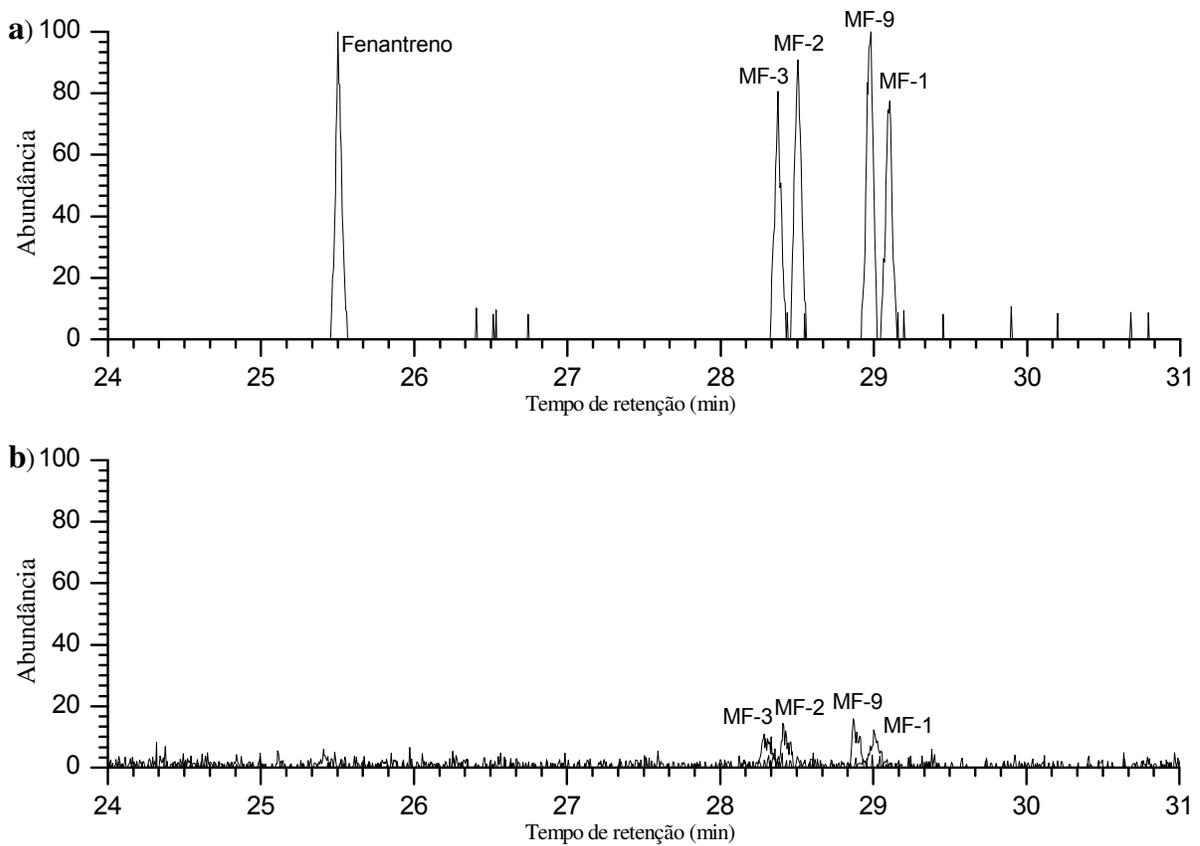


Figura 45 - RIC m/z z 178 (F) + m/z 192 (MFs) obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo PS 1 biodegradadas pelo consórcio microbiano CON1. **a)** 10 dias; **b)** 60 dias.

1.2.4 Terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos

A série dos terpanos também foi encontrada na amostra PS1, mas em menor quantidade que em P1, e diferentemente do que é esperado os terpanos tricíclicos estão sendo consumidos pelo CON1 mesmo frente à resistência da degradação dos hidrocarbonetos lineares de maior peso molecular, **Figura 46**.

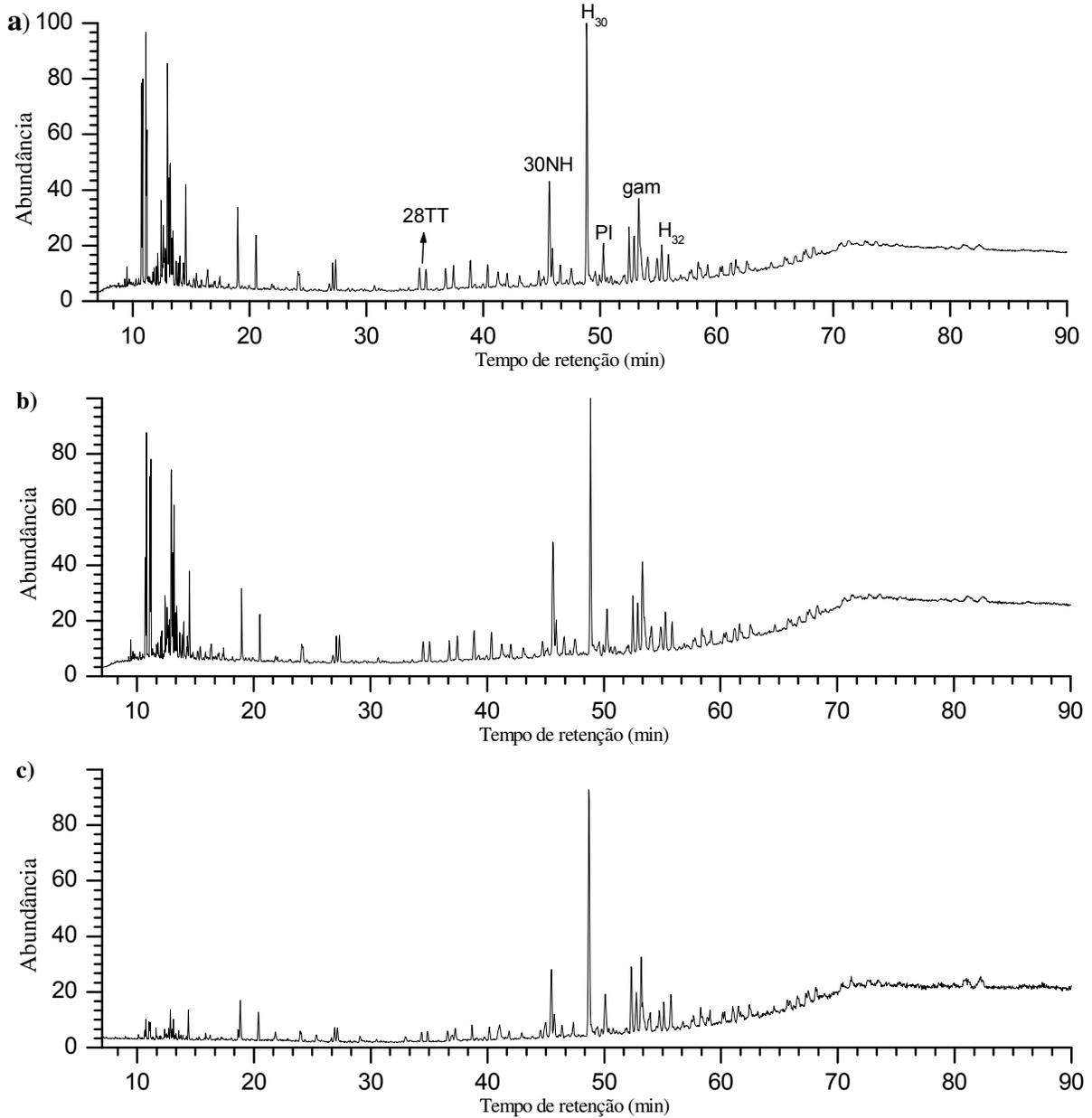


Figura 46 - SIM m/z 191 obtido pela análise por CG/EM da fração F1 do óleo PS1 biodegradadas pelo consórcio microbiano CON1. **a)** 10 dias; **b)** 30 dias e **c)** 60 dias.

E analisando as razões entre os tricíclicos terpanos ($C_{28}TT$ e $C_{29}TT$) e os homohopanos ($C_{32}H$), **Tabela 19**, percebe-se claramente a preferência do CON1 em degradar os TT em relação à série dos homohopanos. Estes que por sua vez permaneceram praticamente intactos durante o período avaliado ($C_{32}H/C_{30}H$). Pôde-se notar também a resistência dos biomarcadores Ts e Tm que mantiveram sua razão quase que inalterada durante o processo. E novamente não vimos o surgimento de *nor*-Hopanos com o decorrer da biodegradação.

Tabela 19 - Parâmetros de correlação da classe do m/z 191 para os ensaios com o CON1.

Razões	10 dias	20 dias	30 dias	40 dias	50 dias	60 dias
$C_{28}TT/C_{32}H$	0.61	0.62	0.48	0.30	0.26	0.30
$C_{29}TT/C_{32}H$	0.80	0.75	0.62	0.45	0.37	0.37
$C_{32}H/C_{30}H$	0.25	0.26	0.28	0.27	0.27	0.28
Ts/Tm+Ts	0.58	0.56	0.53	0.55	0.53	0.57

* para os cálculos dos parâmetros utilizou-se o $C_{32}H$ devido à dificuldade do cálculo da área do $C_{35}H$.

2 Conclusão

Os resultados obtidos de experimentos de biodegradação de petróleo *in vitro* indicaram que os microrganismos isolados atuaram de forma diferente entre si para cada classe de compostos avaliada. Foi possível perceber também que em algumas classes como os hidrocarbonetos essa biodegradação era diferente quando comparada com aquela produzida pelo consórcio (dados não mostrados), mas que quando avaliávamos a soma das tendências víamos que o resultado era bem próximo do observado para o consórcio. Contudo, esse fato não exclui o estudo da degradação *in vitro* com microrganismos isolados, uma vez que quando se utiliza o consórcio microbiano pode ocorrer supressão de algumas atividades enzimáticas menos favorecidas. Portanto, a biodegradação do óleo P1 pelos microrganismos isolados observou-se a seguinte ordem de preferência: hidrocarbonetos lineares > aromáticos leves > bicíclicos > terpanos tricíclicos e hopanos.

Porém, para o consórcio avaliado, recuperado do óleo da bacia Potiguar, frente ao óleo PS 1 observou-se a seguinte seqüência de biodegradação: hidrocarbonetos lineares leves > aromáticos leves > terpanos tricíclicos. Sendo que os hidrocarbonetos lineares mais pesados e hopanos não apresentaram uma biodegradação tão significativa. Fato inédito foi observar que os terpanos tricíclicos foram degradados preferencialmente em relação aos hidrocarbonetos mais pesados.

Todos os resultados nos mostram que os microrganismos recuperados na forma de consórcios podem degradar o petróleo *in vitro* de maneira rápida e semelhante ao que acontece nos reservatórios possibilitando um melhor entendimento dos mecanismos e preferências metabólicas. Contribuindo com

a racionalização dos fenômenos que ocorrem em reservatórios e afetam a qualidade do óleo, dificultando sua exploração e produção comercial.

Parte Experimental

1 Equipamentos e condições empregadas

1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura

Neste trabalho foram utilizados reagentes, solventes e meios de cultura analiticamente puros e/ou indicados pelos fabricantes para uso em diferentes análises. Quando necessário os reagentes foram devidamente purificados antes de seu uso seguindo métodos descritos na literatura.⁶⁴ 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 foram realizados em condições aeróbias e foram manipulados em câmaras de fluxo laminar.

1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises cromatográficas em camada delgada, para monitoramento das reações e acompanhamento das purificações dos produtos, foram realizadas empregando-se cromatofolhas de alumínio (folha padrão 20 x 20 cm), recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência em UV_{254nm} (Merck).

⁶⁴ Perrin, D. D.; Amarego, W. L. F.; Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*, 2ª Ed., Pergamon Press, New York, **1980**.

A revelação dos compostos se deu por irradiação de luz de lâmpada UV_{254/365nm} e/ou pulverização com solução de KMnO₄ ou *p*-anisaldeído (*p*-anisaldeído, H₂SO₄, AcOH e EtOH na razão de 1:2:1:100) e subsequente aquecimento a 300 °C com pistola aquecedora.

1.3 Cromatografia em coluna (CC)

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. Para o fracionamento das amostras de petróleo a sílica foi previamente tratada com clorofórmio e ativada em estufa de 70 °C durante 1h 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.

1.4 Espectrometria de fluorescência

As medidas de fluorescência das reações de triagem enzimática de alto desempenho foram realizadas em leitor de fluorescência Flashscan 530 Analytic Jena, utilizando filtro de excitação de $\lambda_{ex} = 365$ nm e leitura de emissão à $\lambda_{em} = 460$ nm. As leituras foram todas realizadas em placas de polipropileno de 96 poços (fundo plano) a temperatura ambiente (~22 °C) em triplicatas durante 3 minutos com intervalos de 60 segundos entre cada medida.

1.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

As análises por CG/E foram realizadas em cromatógrafo Hewlett Packard 5890II e 6890, acoplado a um detector seletivo de massas HP5970-MSD, operando com uma fonte de elétrons de ionização de 70 eV.

O cromatógrafo é equipado com um injetor tipo split/splitless 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 fenilmetilsilicone. As amostras foram adequadamente diluídas e o volume de 1 µL foi utilizado 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.

2 Amostras estudadas

As amostras de petróleo e água de formação foram coletadas em diferentes graus de biodegradação, profundidade e temperatura no Campo de Pampo Sul, Bacia de campos, RJ e no Campo Pintassilgo, Bacia Potiguar, RN. A **Tabela 20** apresenta as características geoquímicas dos óleos utilizados neste estudo.

Tabela 20 –Características geoquímicas das amostras de óleo utilizadas para obtenção dos consórcios e microrganismos isolados.

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	NOR ₂₅ / H ₃₀ ^d	αββ ^e	Ts / (Ts + Tm) ^f
1	NB (1-2)	82	2405-2588	0,35	1,20	0,06	0,49	0,24
2	B (5-6)	71	1988-2222	0,94	0,97	0,08	0,51	0,32
3	NB (1-2)	48,3	801-803	0,05	1,96	-	0,42	0,54

^a Peter e Moldowan, 1993, NB (não biodegradada), B (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)-hopano (20R + 22S);

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

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

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

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

3 Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise

A vidraria foi lavada, seca e acondicionada com papel para esterilização em autoclave a 121 °C, 1,5 Pa por 20 min, e posterior secagem em estufa 45 °C. Todo material utilizado em contato com os microrganismos foram autoclavados a 121 °C por 40 min antes de serem descartados ou reaproveitados.

Soluções de álcool 70% (v/v) e solução de HClO 5% (v/v) foram utilizadas para desinfetar as bancadas de trabalho e câmara de fluxo laminar, diminuindo contaminação do material manipulado e do meio externo.

4 Preparo de soluções e meios minerais

As soluções e meios minerais descritos neste item foram utilizados nos enriquecimentos para obtenção dos consórcios e microrganismos isolados, nos ensaios de biodegradação e no estudo das atividades enzimáticas dos microrganismos.

Meio Zinder: este meio foi utilizado nos enriquecimentos e ensaio aeróbios de atividade enzimática e biodegradação. E 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 ultra pura. O meio foi esterilizado e armazenado em frasco Schott à temperatura ambiente. O pH final do meio Zinder foi ajustado para 7,0 utilizando-se solução de KOH 5M e HCL 6M quando necessário.

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 a 4 °C.

Solução de vitaminas: dissolveu-se 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; 0,01 g de piridoxima.HCl; 0,0001 g de vitamina B₁₂; 0,005 g de ácido lipóico em 1000 mL de água Milli-Q. As soluções foram esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm, distribuídas em frascos de penicilina de 50 mL mantidas sob fluxo de N₂ por 2 minutos, lacrados e armazenados a 4 °C.

5 Enriquecimento para obtenção dos microrganismos

Utilizou-se técnicas de enriquecimento microbiano com diferentes meios de cultivo para recuperar consórcios aeróbios com diferentes morfotipos cultiváveis presente nas amostras de 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 adicionado de NaCl 1,5%, para recuperar bactérias halofílicas moderadas;
- (c) Meio mineral Zinder acrescido de solução traço de metais e vitaminas;
- (d) Caldo Marinho (MB);
- (e) Caldo de Tryptona-Soja (TSB), Oxoid;
- (f) GYM – meio rico em nutriente composto por 4 g de glicose, 4 g de extrato de levedura, 10 g de extrato de malte e 1000 mL de água

destilada, pH 7,2. (para o preparo do meio sólido é adicionado 2 g de carbonato de cálcio e 12 g de Agar);

(g) GYM acrescido de 1,5% de NaCl.

Obs.: Quando necessário meio sólido utilizou-se os respectivos meios comerciais acrescidos de Agar.

5.1 Obtenção dos consórcios aeróbios

Os enriquecimentos foram realizados em erlenmeyers de 500 mL, contendo 300 mL de cada um dos meios de cultura citados acima e 40 mL da amostra de petróleo. Todas as amostras de petróleo quando necessário foram aquecidas em banho-maria a 30 °C durante 30 minutos antes de adicioná-las aos meios de cultura, para facilitar a transferência.

Os erlenmeyers foram então incubados em agitador rotacional (modelo MA-420, Marconi) 200 rpm, a 28 C, durante 20 dias. O consórcio foi então repicado em um novo meio de cultura, os consórcios obtidos foram preservados por métodos de liofilização e criopreservação.

5.2 Obtenção dos microrganismos isolados

A fim de isolar os microrganismos dos consórcios obtidos adicionou-se alíquotas de 0,1 e 1 mL dos ensaios de enriquecimento (com 10 e 20 dias de ensaio) em placas de Petri contendo 20 mL dos respectivos meios com Agar e no caso do meio Zinder utilizou-se o meio sólido nutriente Agar. Então se incubou as placas em incubadora B.O.D. (modelo MA 415, Marconi), a 28 C, durante 3 dias. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

A purificação das bactérias aeróbias isoladas foi realizada através de sucessivos repiques em forma de estrias nos respectivos meios sólidos através da técnica de esgotamento. As culturas foram então analisadas por suas características macroscópicas (cor e brilho), microscópica (forma e tamanho da colônia). Estes ainda serão enviados ao CPQBA-UNICAMP para serem submetidos a técnicas moleculares de identificação.

6 Ensaios enzimáticos de alto desempenho (HTS)

Os microorganismos utilizados nos ensaios de HTS foram cultivados em “slants” contendo meio de cultivo específico por 24 h. Após esse tempo, as células foram transferidas para *Eppendorf* estéril, onde foram pesadas e suspensas em tampão borato pH 8,8 a 20 mM, e posteriormente diluídas a fim de obter suspensões celulares de 0,2 mg mL⁻¹. Os ensaios e controles foram realizados em duplicatas e montados da seguinte maneira:

- **Ensaios:** 10 µL das sondas 2 mM, 80 µL de BSA 5,0 mg mL⁻¹, 100 µL de suspensão celular 0,2 mg mL⁻¹, e 10 µL de NaIO₄ 20 mM por poço.
- **Controle positivo:** 10 µL do produto a 2 mM, 80 µL de BSA 5,0 mg mL⁻¹, 100 µL de suspensão celular 0,2 mg mL⁻¹, e 10 µL de NaIO₄ 20 mM por poço.
- **Controle negativo:** 10 µL das sondas 2 mM, 80 µL de BSA 5,0 mg mL⁻¹, 100 µL de solução tampão borato pH 8,8 e 10 mL de NaIO₄ 20 mM por poço.
- **Controle microbiano:** 10 µL de solução tampão borato pH 8,8, 80 µL de BSA 5,0 mg mL⁻¹, 100 µL de suspensão celular 0,2 mg mL⁻¹, e 10 µL de NaIO₄ 20 mM por poço.

6.1 Prepara da solução tampão borato

Inicialmente preparou-se uma solução estoque de H_3BO_3 0,2 M dissolvendo-se 12,4 g do ácido em 1,0 L de água destilada, e solução estoque de bórax 0,05 M dissolvendo-se 19,05 g do sal em 1,0 L de água destilada. Em seguida a solução tampão com pH desejado foi preparada adicionando-se 50 mL da solução de H_3BO_3 a um volume da solução de bórax, segundo **Tabela 21** e diluindo para um volume final de 200 mL com água destilada.

Tabela 21 – Solução Tampão ácido bórico-bórax.

Solução bórax 0,05 M (mL)	pH	Solução bórax 0,05 M (mL)	pH
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

6.2 Preparo de soluções

6.2.1 Sondas fluorogênicas

As soluções foram inicialmente solubilizadas acetonitrila (ACN) numa concentração de 20 mM, e posteriormente diluídas para uma concentração de 2 mM em ACN:H₂O (1:1). Soluções estas conservadas a -20 °C.

6.2.2 Periodato de sódio

As soluções de periodato de sódio forma sempre preparadas momentos antes do experimento, dissolvendo-se 4,3 mg de NaIO_4 em 1 mL de água *milli-Q* resultando numa concentração final de 20 mM.

6.2.3 Solução de BSA

A solução de albumina do soro bovino (BSA) a 2 mg/mL utilizada nos experimentos de HTS foram preparadas através da dissolução de 5 mg de BSA em 1 mL da solução tampão borato, seguida de suave agitação para evitar o surgimento de bolhas.

7 Ensaios de biodegradação

Os ensaios foram realizados para monitorar o potencial de biodegradação dos consórcios aeróbios, utilizando o petróleo P1 e PS1 como fonte de carbono principal, através da comparação dos perfis cromatográficos obtidos por CG/EM.

7.1 Ensaios de biotransformação convencionais (multibioreações)

Os microorganismos foram primeiramente cultivados em agar inclinado (slant) contendo o meio de cultivo adequado, e posteriormente transferidos para erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultivo líquido, e inoculados de 3-4 dias a 28 ° C sob agitação (150 rpm). Após esse período de crescimento, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos a 18 °C, e posteriormente ressuspensas em meio Zinder adicionado de 0,5 mL de solução de vitaminas e de 0,5 mL de solução de bicarbonato de sódio 10%.

Foram adicionadas 2,0 g de célula (peso úmido) a cada 40 mL meio Zinder pH 7,0 em erlenmeyers de 125 mL, e 10 µL de cada substrato. A suspensão resultante foi agitada em agitador orbital (shaker) a temperatura de 28 °C, e monitoradas periodicamente (a cada 7 dias durante 28 dias) realizando-se extrações totais. As alíquotas foram extraídas com 20 mL de acetato de etila (2x 10 mL), por separação em funil de extração, após

saturação da fase aquosa com NaCl. A fase orgânica superior foi retirada e seca sobre MgSO₄ anidro para remoção de traços de água e subsequente análise por CG/EM. As amostras para CG/EM foram preparadas na concentração de 1 mg.mL⁻¹ com solvente contendo 0,03 mg.mL⁻¹ de nonadecano como padrão interno.

7.2 Biodegradação de petróleo com microrganismos isolados

Os microrganismos isolados, obtidos dos consórcios, foram cultivados em seus respectivos meios líquido de cultivo por durante 3 dias. Os ensaios foram então 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 40 mL do 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. Os experimentos foram todos realizados em duplicata monitorados em 30 e 60 dias.

Os biomarcadores avaliados no processo de biodegradação tiveram seus índices de retenção (IR) calculados, e avaliou-se o efeito da biodegradação em diversos parâmetros de correlação.

$$IR = \left[\left(\frac{Ts - TC_{n-1}}{TC_n - TC_{n-1}} \right) \times 100 \right] + 100 \times C_{n-1}$$

Onde:

Ts = tempo de retenção da substância analisada;

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

TC_n = tem de retenção do alcano que elui depois da substância analisada;

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

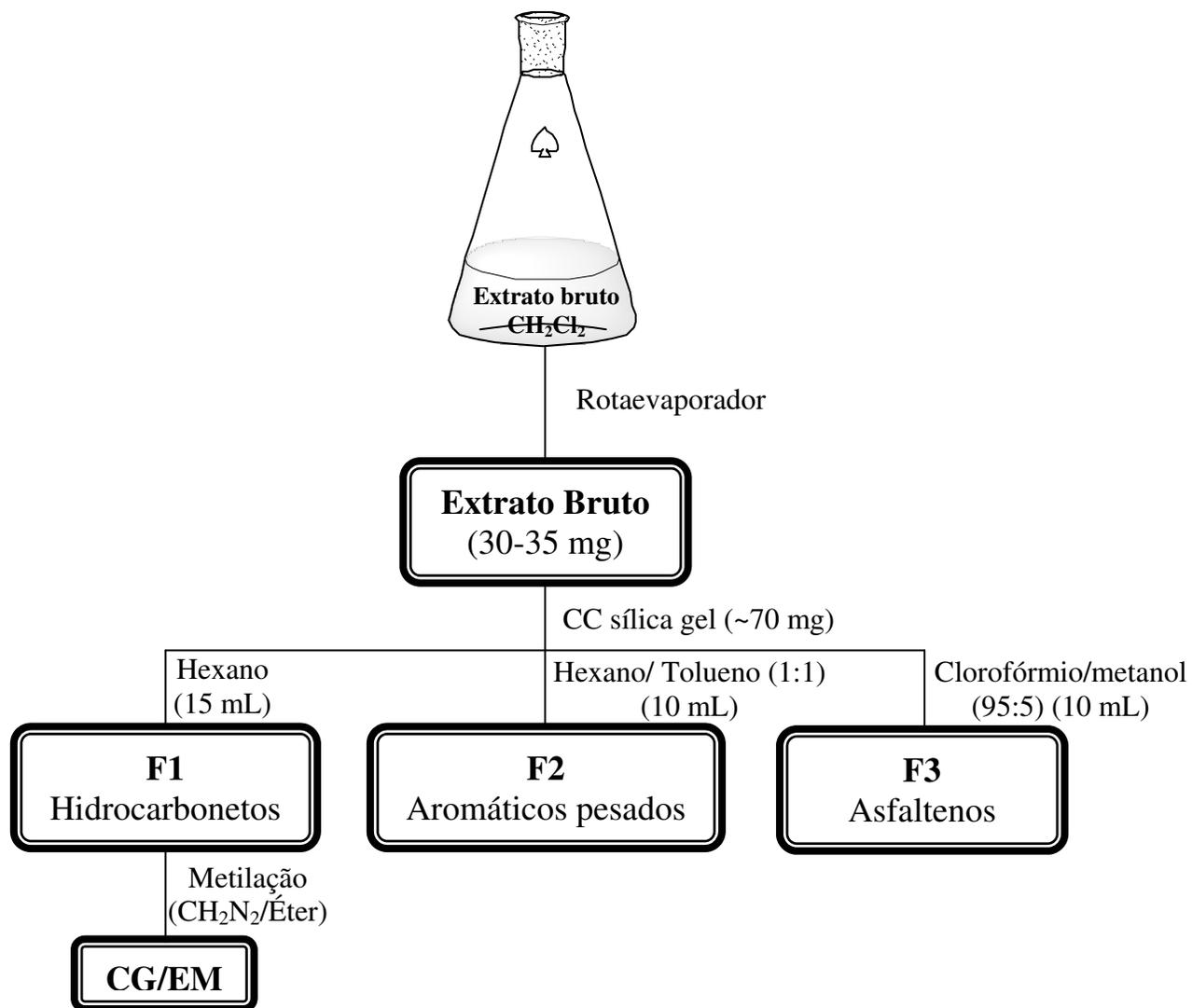
7.3 Tratamento estatístico dos óleos

Para todos os ensaios foi feito pré-tratamento dos extratos brutos obtidos dos ensaios de biodegradação com o intuito de se fracionar o extrato para obter frações neutras e aromáticos leves (F1), aromáticos pesados (F2) e asfaltenos (F3) para posterior análise por CG/EM.

7.3.1 Obtenção da frações neutras

Os extratos brutos, realizados a cada 30 dias num período de 60 dias através da extração com 2x10 mL de CH_2Cl_2 , foram submetidos a um fracionamento cromatográfico em coluna cromatográfica utilizando sílica gel, previamente tratada, obtendo-se 3 (três) frações neutras distintas: hidrocarbonetos saturados, insaturados e aromáticos leves(F1); aromáticos pesados (F2); resinas e asfaltenos (F3).

As diferentes frações foram obtidas através da eluição do extrato com diferentes solventes: 15 mL de hexano (F1), 10 mL de hexano:tolueno (1:1) (F2) e 10 mL clorofórmio:metanol (95:5) (F3). A fração F1 foi então evaporada, metilada com diazometano em éter para posterior análise em CG/MS, onde pesamos 6 mg da fração 1 obtida e a diluímos em 1 mL de hexano bidestilado, **Fluxograma 1**.



Fluxograma 1 – Método de obtenção das frações neutras.

Tabela 22 – Massas obtidas das frações para todos os experimentos

Período		Microrganismo							
		SG10-1		SG10-2		SG12-1		SG12-2	
		Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)
30 dias	F1	-	-	20,7	9,2	27,9	10,2	-	-
	F2		-		3,6		4		-
	F3		-		13,3		13,9		-
60 dias	F1	-	-	36,3	5,4	25,9	6,8	-	-
	F2		-		4,5		2,2		-
	F3		-		8		4,9		-
Período		SG13-1		SG13-2		SG16-1		SG16-2	
		Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)
30 dias	F1	23,7	7,4	26,5	9,7	29,7	14,9	28,2	14,6
	F2		3		3,6		4,1		3,7
	F3		9,2		7,7		9,9		8,5
60 dias	F1	16,2	5,4	24,2	8,8	26,1	13,5	37,6	15,7
	F2		2,1		2,9		4,1		3,5
	F3		5		6,7		6,5		8,4
Período		SG26-1		SG26-2		SG29-1		SG29-2	
		Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)
30 dias	F1	34,3	16,9	27,2	13,4	31,3		27,9	
	F2		5,6		3,7				
	F3		8,2		4,1				
60 dias	F1	36,9	20,5	25,2	19,6	26,5		28,4	
	F2		4,1		5,8				
	F3		11,2		7				

Período		SG30-1		SG30-2		SG37-1		SG37-2	
		Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)
30 dias	F1	27,5	11,7	40,2	19,3	32,1	14,1	32,2	12
	F2		3,2		5,8		3,5		2,7
	F3		8		10		10,5		8,4
60 dias	F1	18,4	6,3	22	9,5	28,5	13,3	27,5	12,5
	F2		1		2,2		3		2,6
	F3		4,5		7		10		11,1
Período		SG42(1)-1		SG42(1)-2		SG01-1		SG01-2	
		Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)
30 dias	F1	28,6	13,2	39,7	19,9	39,1	19	39	19,6
	F2		2,8		5		3,5		3,3
	F3		8,9		12,1		12,9		12,3
60 dias	F1	38,4	18,3	33,4	15,3	-	21,1	41,1	20,2
	F2		5		4,8		4,5		3,7
	F3		13,1		9,4		13,4		12,9
Período		SG32-1		SG32-2		Controle - 1		Controle - 2	
		Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)	Bruto (mg)	Frações (mg)
30 dias	F1	7,3	14,7	24	5	35	16,8	33,6	16,5
	F2		2,8		3,1		4,3		4,4
	F3		10,6		8,9		7,9		8
60 dias	F1	25,3	-	24	-	22,8	11,4	41,3	21
	F2		-		-		2,5		4,4
	F3		-		-		7,1		13,8

7.4 Métodos de Análise

7.4.1 Cromatografia e espectrometria de massas

Após fracionamento das frações as amostras foram analisadas utilizando um CG HP6890 acoplado a detector seletivo de massas (HP 5970-MSD) através das técnicas de varredura de íons totais (TIC, *Total Ion Chromatogram*) e monitoramento de íons seletivo (SIM, *Single Ion Monitoring*).

Os programas utilizados para detecção e monitoramento dos biomarcadores presentes na fração neutra estão descritos a seguir:

- ✓ **Programa I** (análise de alcanos, isoprenóides, aromáticos leves e sesquiterpanos bicíclicos): Injetor a 300 °C; Linha de transferência a 260 °C; Forno a 80 °C por 2 minutos, eleva-se a temperatura até 270 °C a 4 °C/min, depois se eleva novamente até 300 °C a 10 °C por minuto e mantém nessa temperatura por 25 minutos. Coluna capilar MDN5S 30m.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 por 2 minutos, eleva-se a temperatura a 190 °C a 30 °C/min, depois se eleva novamente a 250 °C a 1 °C/min, e novamente a 300 °C a 2 °C/min e mantém a temperatura por 25 minutos. Coluna capilar MDN5S 30m.0,25mm.0,25µm;

- ✓ **Técnicas de análise por EM:** para todos os programas foram feito varredura de íon totais (TIC) e monitoramento seletivo de íons (SIM).

8 Apêndice I

As bibliotecas utilizadas para comparação com os espectros de massas obtidos foram a Wiley 275 e NIST (*National Institute of Standards and Technology*) e o índice de similaridade dos espectros experimentais com os espectros das bibliotecas serão mostrados junto aos cromatogramas. Sendo que para a biblioteca Wiley esse valor é reportado na forma de Qualidade (Qual) que varia de 0 a 100 e para a biblioteca NIST *match* e *r. match* que variam de 0 a 1000.

Composto 19

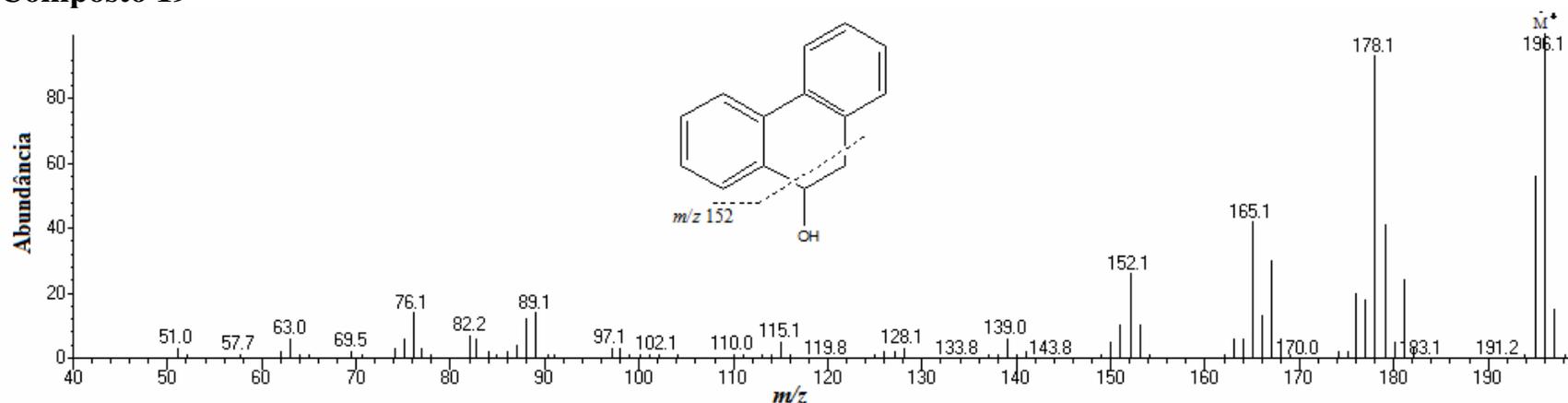


Figura 47 - Espectro de massas do composto **19** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10 diidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **19** não existia nas biblioteca de espectros de massas utilizada, mas com base nos íons fragmentos obtidos e nos outros compostos encontrados sugeriu-se a estrutura do 9,10-diidro-9-hidroxi-fenantreno

para o composto detectado. Podemos observar na **Figura 47** os íons fragmentos m/z 196, 178, 165 e 152 correspondentes ao íon: molecular, perda de uma molécula de água, perda do radical CH_2OH e perda da molécula CH_2CHOH respectivamente.

Composto 20

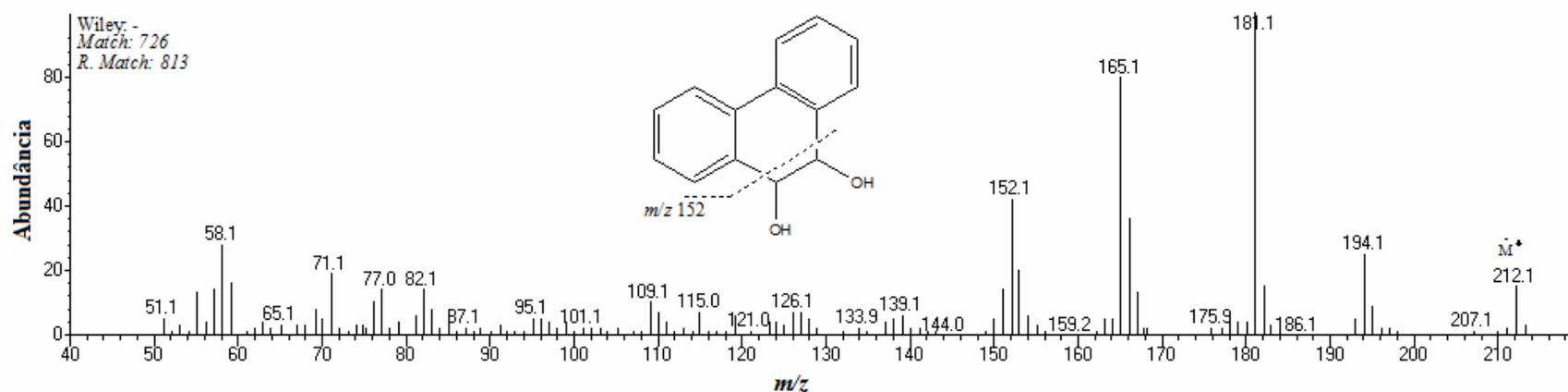


Figura 48 - Espectro de massas do composto **20** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10 diidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **20** apresentou o espectro de massas da **Figura 48**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 212, 194, 181, 165 e 152 correspondentes ao íon molecular, perda de uma molécula de água, do radical CH_2OH , perda de uma molécula de água seguida de radical CHO e perda de molécula de água seguida da molécula

CH₂CO respectivamente. Com base nisso sugeriu-se que o composto **20** seria o 9,10-diidro-9,10-diidroxifenantreno.

Composto 21

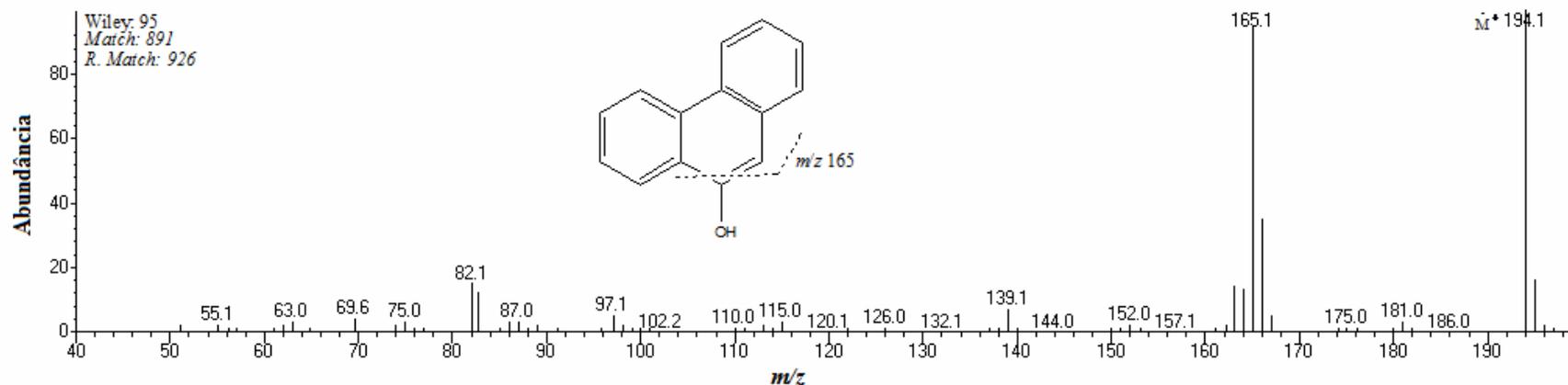


Figura 49 - Espectro de massas do composto **21** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10 diidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **21** apresentou o espectro de massas da **Figura 49**, onde podemos observar os íons fragmentos de *m/z* 194 e 165 correspondentes ao íon molecular e perda de um radical CHO respectivamente. Com base nisso sugeriu-se que o composto **21** seria o 9-hidroxifenantreno.

Composto 22

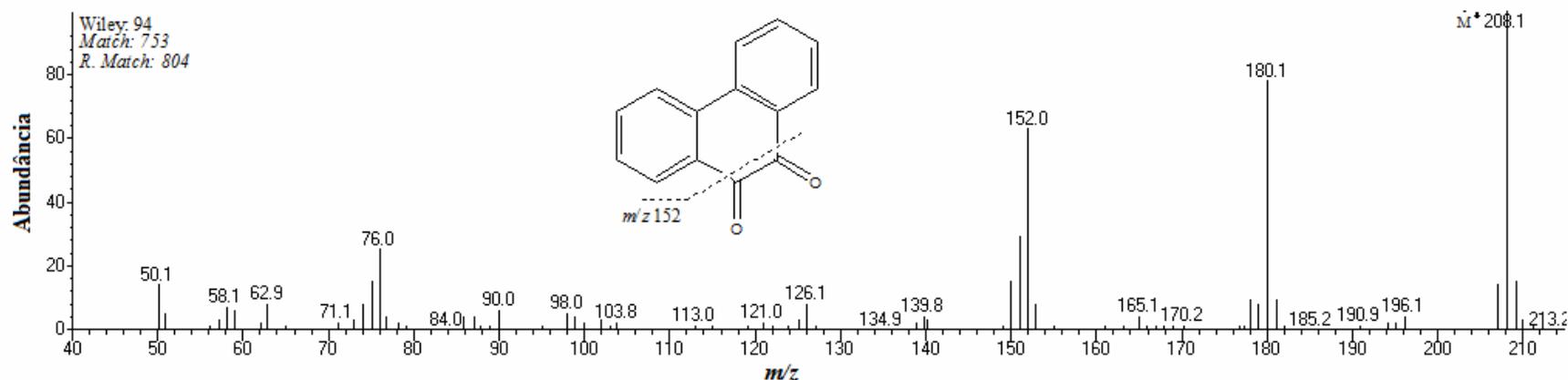


Figura 50 – Espectro de massas do composto **22** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10-diidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **22** apresentou o espectro de massas da **Figura 50**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 208, 180 e 152 correspondentes ao íon molecular, perda de uma molécula de CO e perda de uma segunda molécula de CO respectivamente. Com base nisso sugeriu-se que o composto **22** seria a 9,10-fenantrenodiona.

Composto 23

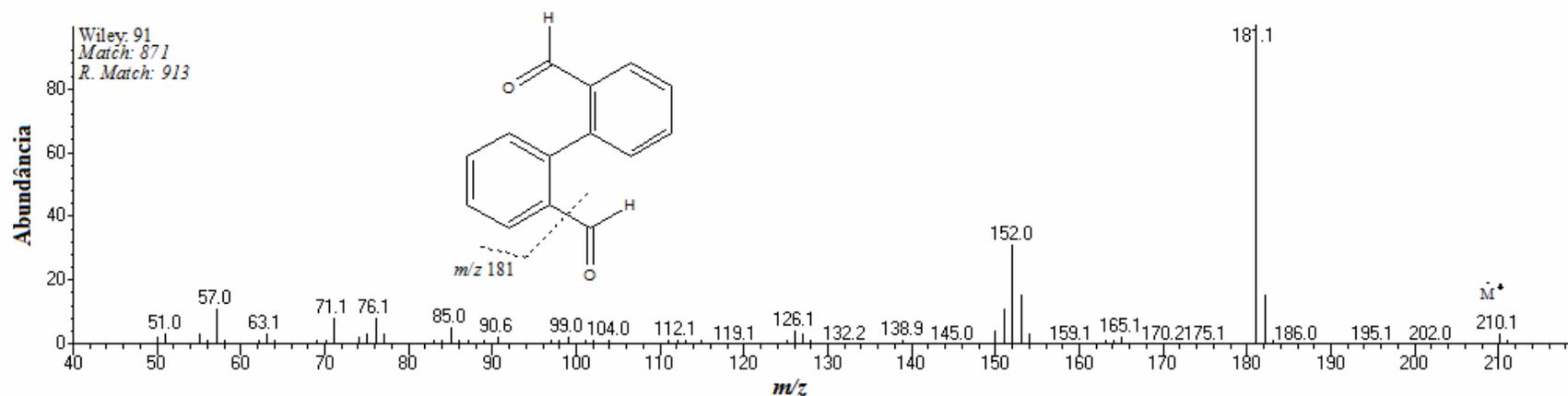


Figura 51 – Espectro de massas do composto **23** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ácido nonadecanoico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10-diidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **23** apresentou o espectro de massas da **Figura 51**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 210, 181 e 152 correspondentes ao íon molecular, perda de um radical CHO e perda de um segundo radical de CHO respectivamente. Com base nisso sugeriu-se que o composto **23** seria (1,1'-bifenil)-2,2'-dicarboxaldeo.

Composto 24

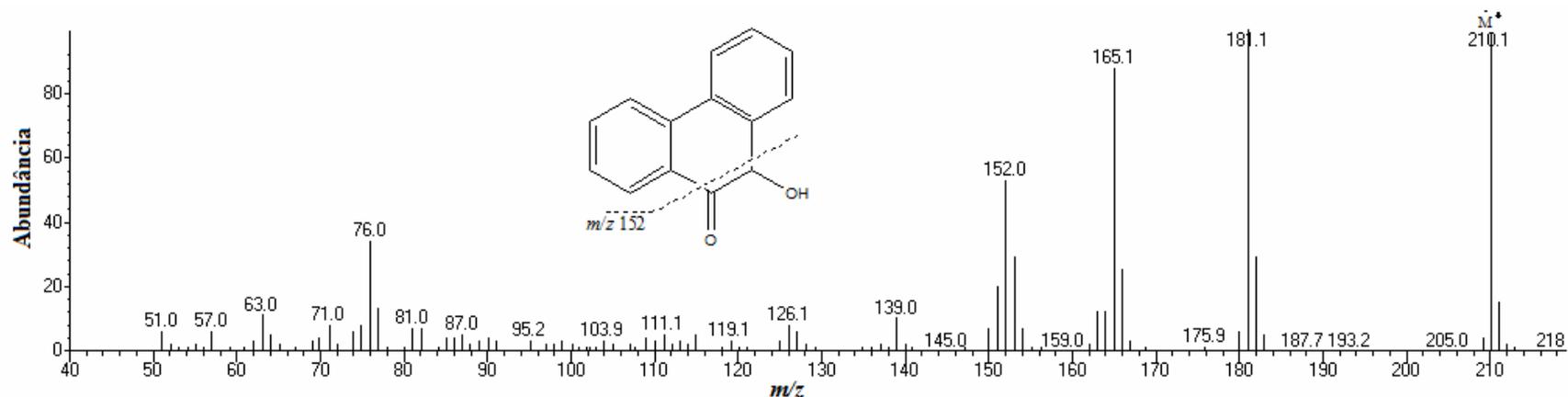


Figura 52 – Espectro de massas do composto **24** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ácido nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10-dihidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **24** apresentou o espectro de massas da **Figura 52**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 210, 181, 165 e 152 correspondentes ao íon molecular, perda de uma molécula de CO, perda de um radical COOH e perda de CO seguida de radical CHO respectivamente. Com base nisso sugeriu-se que o composto **24** seria 10-hidroxi-9,(10H)-fenantrenona.

Composto 25

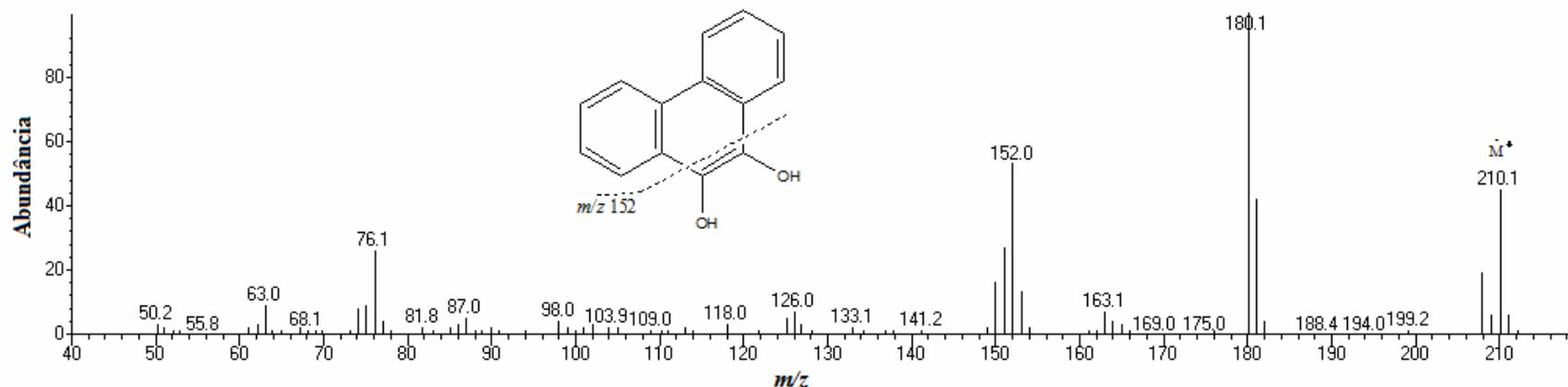


Figura 53 – Espectro de massas do composto **25** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10-diidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **25** apresentou o espectro de massas da **Figura 53**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 210, 180 e 152 correspondentes ao íon molecular, perda de uma molécula de CH_2O e perda de uma molécula CH_2O seguida de CO respectivamente. Com base nisso sugeriu-se que o composto **25** seria 9,10-fenantrenodiol.

Composto 26

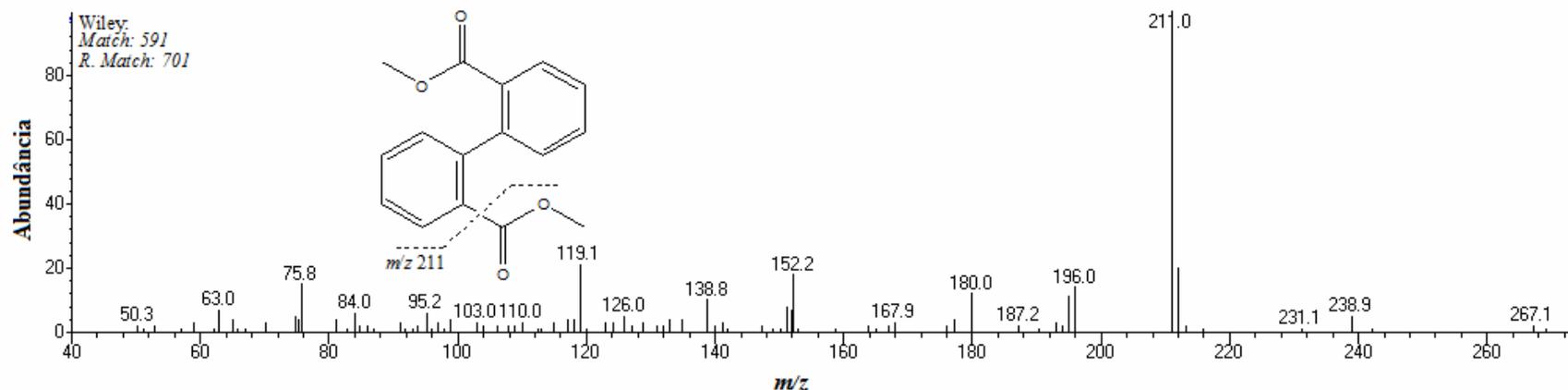


Figura 54 – Espectro de massas do composto **26** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10-diidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **26** apresentou o espectro de massas da **Figura 54**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 211, 196, 180 e 152 correspondentes a perda de um radical COOMe, perda de um radical COOMe seguida de radical CH₃, perda de um radical COOMe seguida de radical OCH₃ e perda de dois radicais COOMe respectivamente. Com base nisso sugeriu-se que o composto **26** seria 2,2'-dimetilester do ácido (1,1'-Bifenil)-2,2'-dicarboxílico.

Composto 28

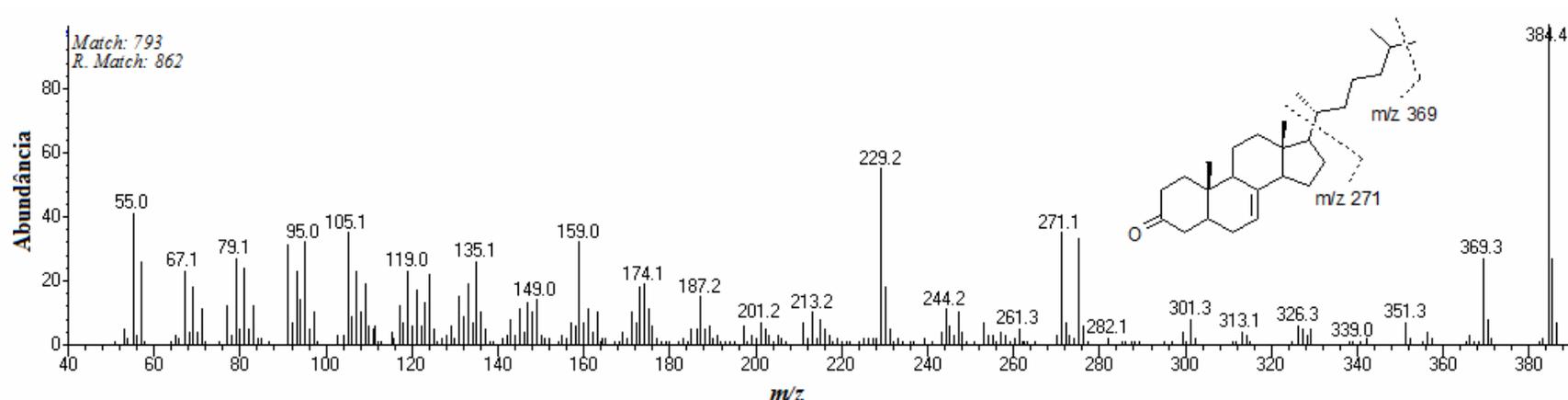


Figura 55 – Espectro de massas do composto **28** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10-diidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **28** apresentou o espectro de massas da **Figura 55**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 384, 369, 271, 229 e 95 correspondentes ao íon molecular, perda de um radical CH_3 , perda da cadeia lateral, perda de três metilas (C_{19} , C_{22} e C_{26}) e clivagem entre o anel A e B e perda da uma metila (C_{21}) e clivagem entre o anel A e B. Com base nisso sugeriu-se que o composto **28** seria 7-colesten-3-one.

Composto 29

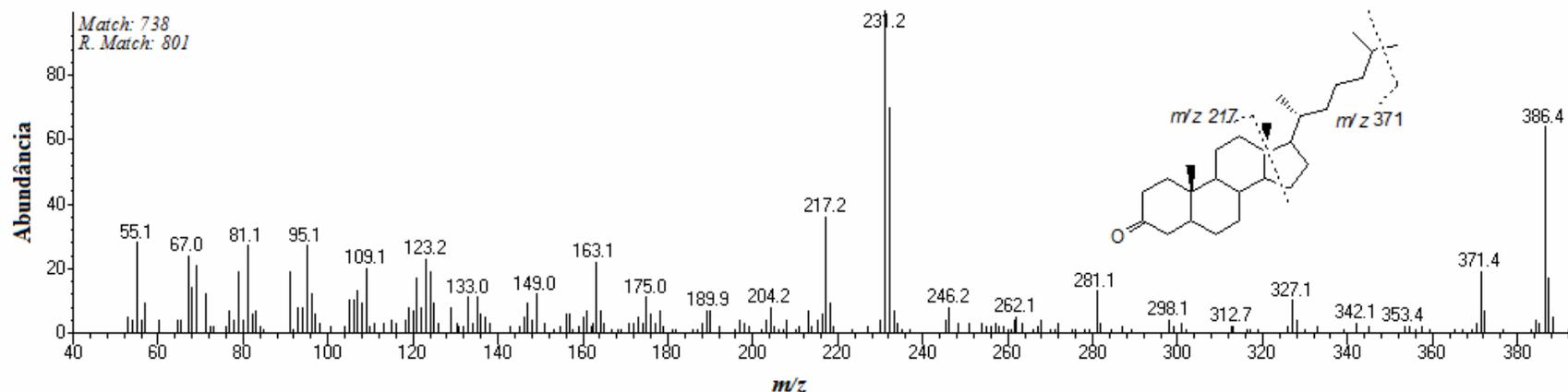


Figura 56 – Espectro de massas do composto **29** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10 diidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **29** apresentou o espectro de massas da **Figura 56**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 386, 371, 231, 217 e 95 correspondentes ao íon molecular, perda de um radical CH_3 , perda de três metilas (C_{19} , C_{22} e C_{26}) e clivagem entre o anel A e B e perda da uma metila (C_{21}) e clivagem entre o anel A e B. Com base nisso sugeriu-se que o composto **29** seria a 3-colestenona.

Composto 30

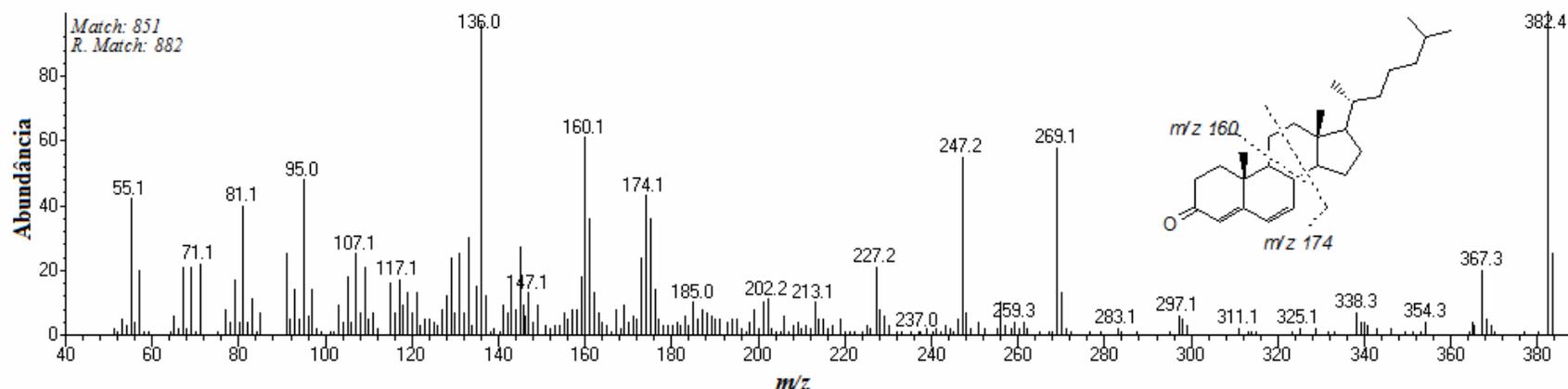


Figura 57 – Espectro de massas do composto **30** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ácido nonadecanoico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10-diidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **30** apresentou o espectro de massas da **Figura 57**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 382, 367, 269, 174 e 160 correspondentes ao íon molecular, perda de um radical CH_3 , perda de cadeia lateral, clivagem no meio do anel C e clivagem entre anel B e C. Com base nisso sugeriu-se que o composto **30** seria a colesta-4,6-dien-3-ona.

Composto 31

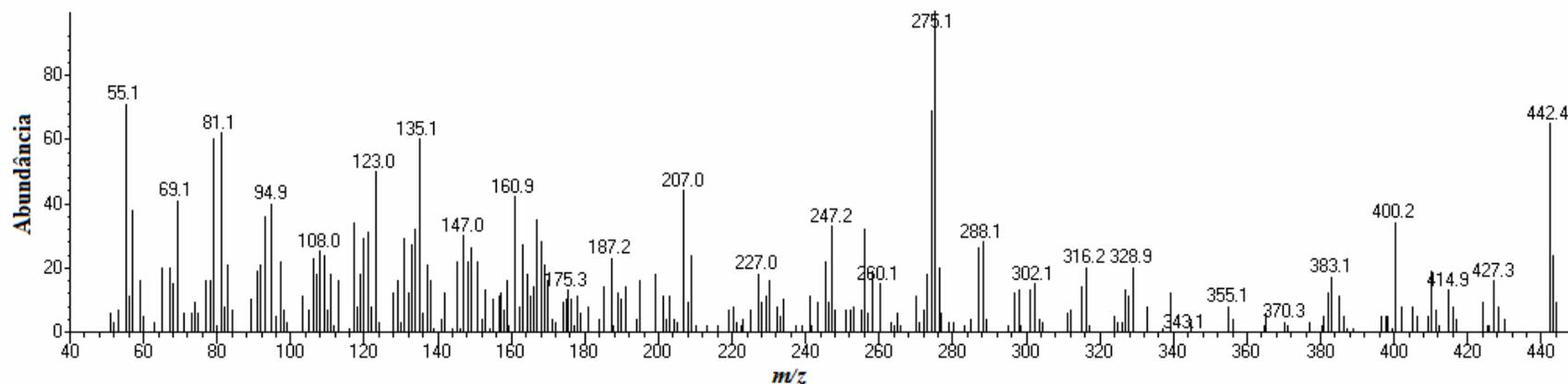


Figura 58 – Espectro de massas do composto **30** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 7 dias de reação com a bactéria CFA 21 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10 diidrofenantreno (**18**) como substratos.

O composto **31** apresentou o espectro de massas da **Figura 58**, contudo não foi possível chegar a propor uma estrutura.

Composto 32

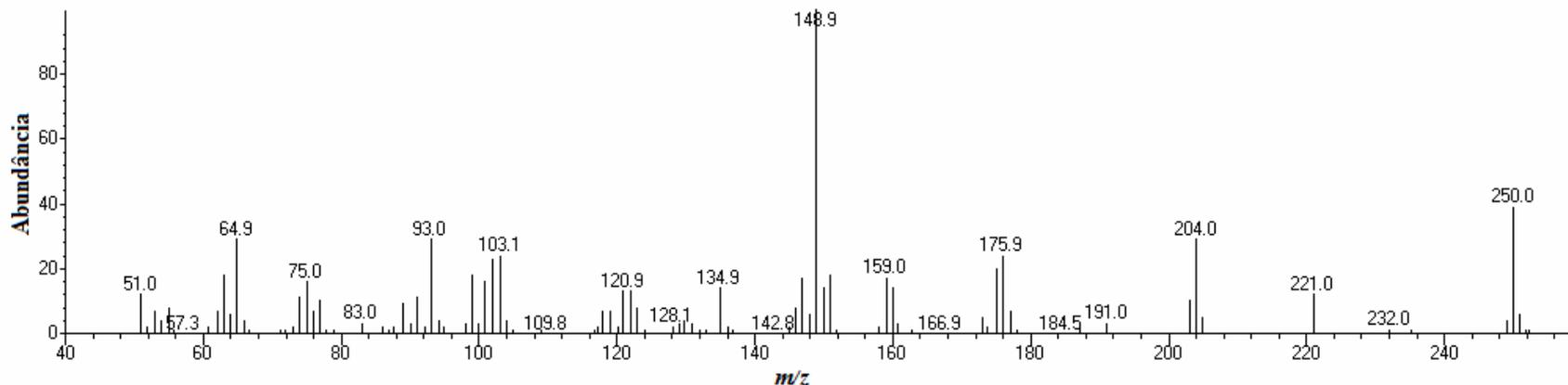


Figura 59 - Espectro de massas do composto **32** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 28 dias de reação com a bactéria CFA 03 utilizando esqualano (**15**), ácido nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**) como substratos.

O composto **32** apresentou o espectro de massas da **Figura 59**, onde com base nos fragmentos obtidos e comparação com o espectro do composto **33** podemos observar que houve a inserção de mais um átomo de oxigênio e a diminuição de uma insaturação, contudo não foi possível chegar a sugerir uma estrutura viável.

Composto 33

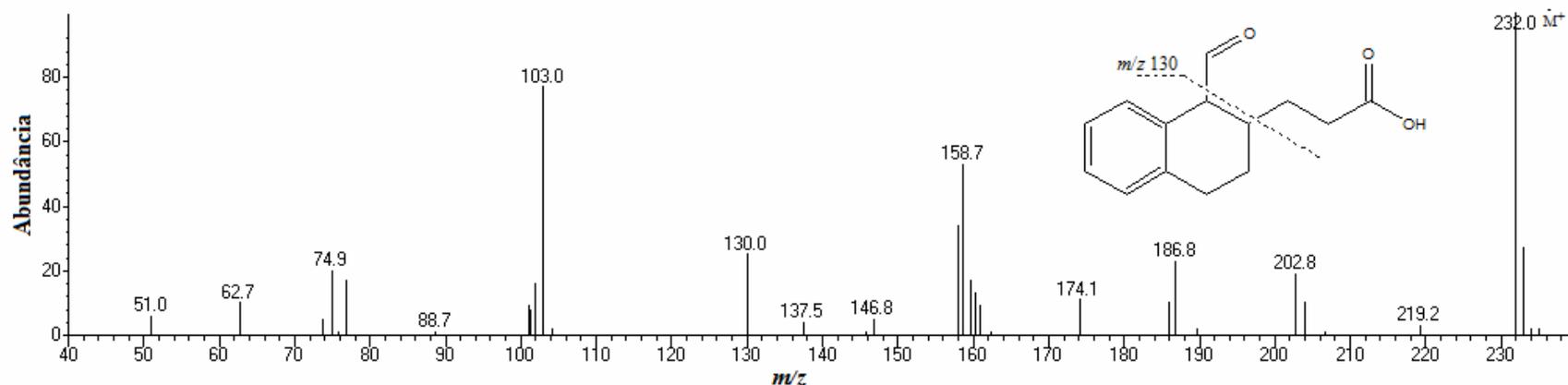


Figura 60 – Espectro de massas do composto **33** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato bruto metilado após 28 dias de reação com a bactéria CFA 03 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**) como substrato.

O composto **33** apresentou o espectro de massas da **Figura 57**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 232, 203, 187, 159, 130 e 103 correspondentes ao íon molecular, perda de molécula de CO, perda de radical COOH, perda da cadeia lateral do ácido, perda das duas cadeias laterais e perda das duas cadeias laterais mais CHCH do anel B. Com base nisso sugeriu-se que o composto **33** seria a colest-4,6-dien-3-ona.

Composto 34

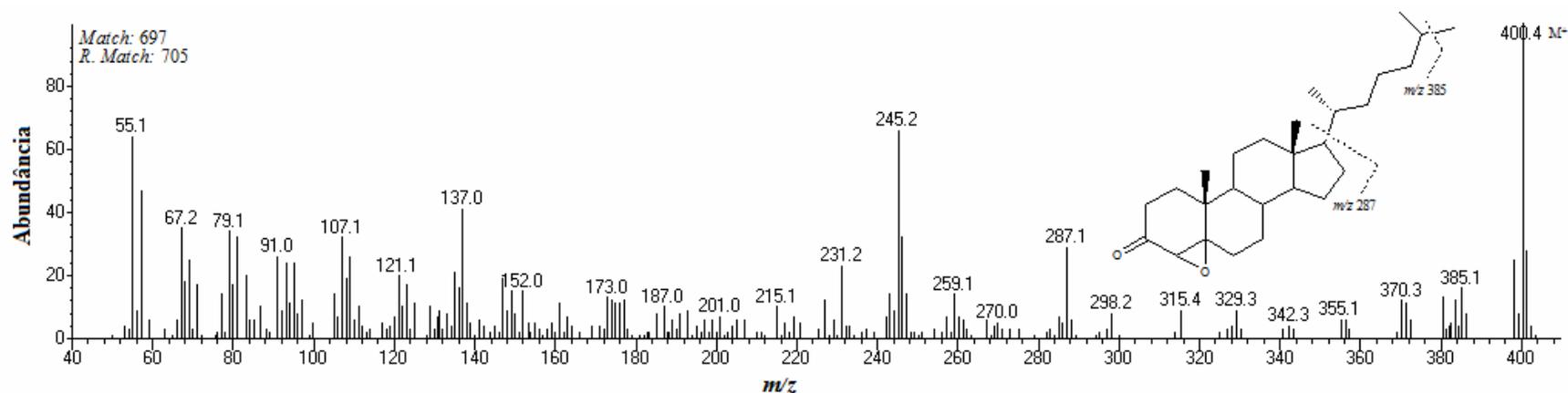


Figura 61 – Espectro de massas do composto **34** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 21 dias de reação com a bactéria CFA 06 utilizando esqualano (**15**), ácido nonadecanoico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10-dihidrofenantreno (**18**) como substrato.

O composto **34** apresentou o espectro de massas da **Figura 61**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 400, 385, 370, 355, 315, 287, 259, 245, 231 e 137 correspondentes ao íon molecular, perda de um radical CH_3 , perda de dois radicais CH_3 , perda de três radicais CH_3 , perda de parte da cadeia lateral, perda da cadeia lateral, clivagem do anel D, clivagem entre o anel C e D, clivagem entre o anel C e D mais perda de uma metila e clivagem do anel B. Com base nisso sugeriu-se que o composto **34** seria a 4,5-epoxi-3-colestanona.

Composto 35

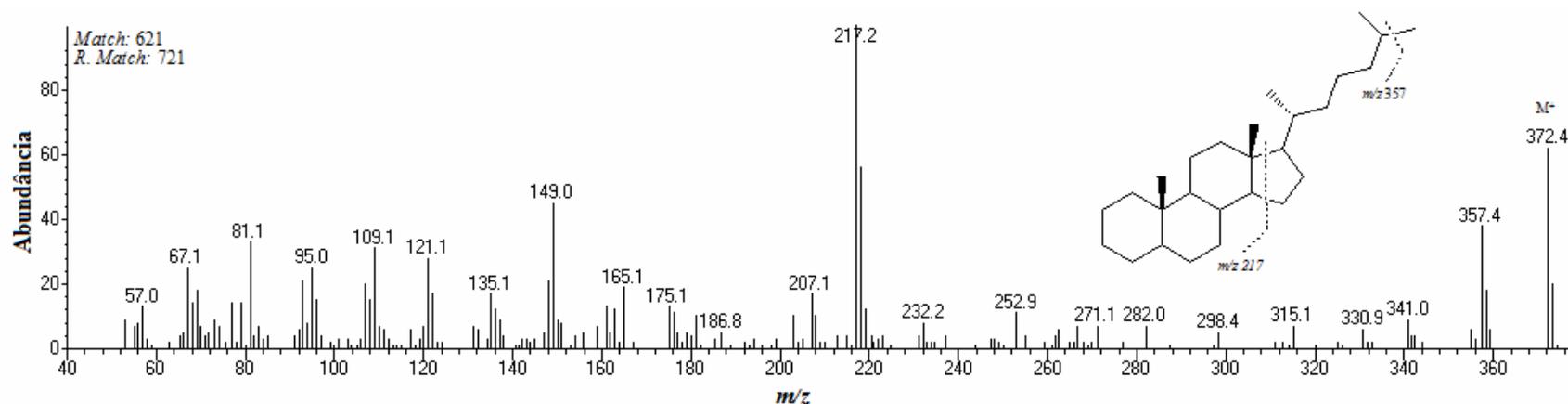


Figura 62 – Espectro de massas do composto **35** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 21 dias de reação com a bactéria CFA 06 utilizando esqualano (**15**), ácido nonadecanoico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10-diidrofenantreno (**18**) como substrato.

O composto **35** apresentou o espectro de massas da **Figura 62**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 372, 357, 217, 165 e 149 correspondentes ao íon molecular, perda de um radical CH_3 , clivagem entre o anel C e D, clivagem do anel C e clivagem entre anel B e C. Com base nisso sugeriu-se que o composto **35** seria o colestano.

Composto 36

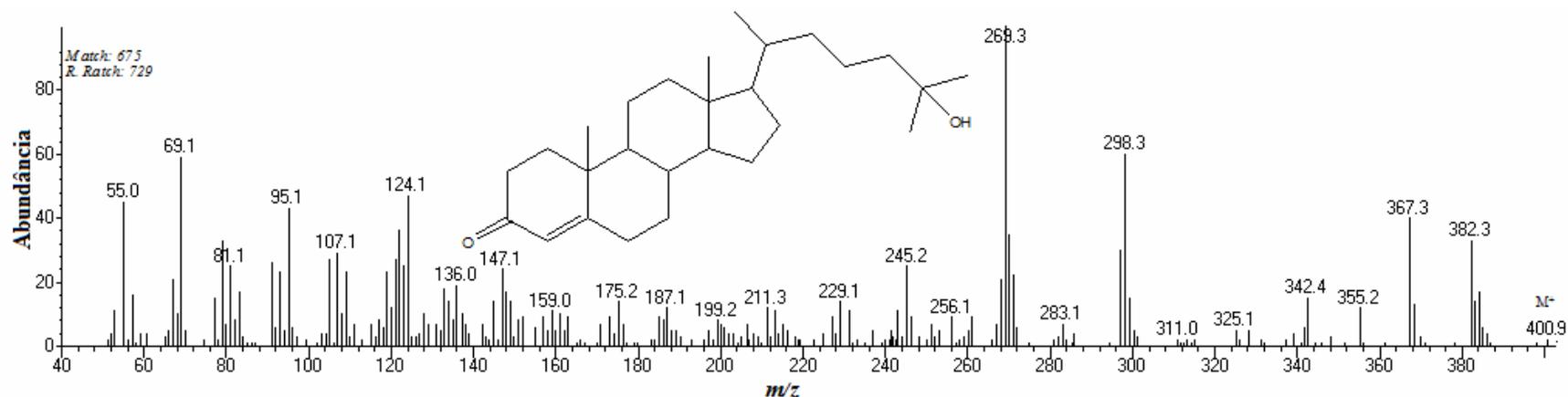


Figura 63 – Espectro de massas do composto **36** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 21 dias de reação com a bactéria CFA 06 utilizando esqualano (**15**), ácido nonadecanoico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e 9,10-diidrofenantreno (**18**) como substrato.

O composto **36** apresentou o espectro de massas da **Figura 63**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z correspondentes ao íon molecular, perda de um radical CH_3 , clivagem entre o anel C e D, clivagem do anel C e clivagem entre anel B e C. Com base nisso sugeriu-se que o composto **35** seria o colestano.

Composto 37

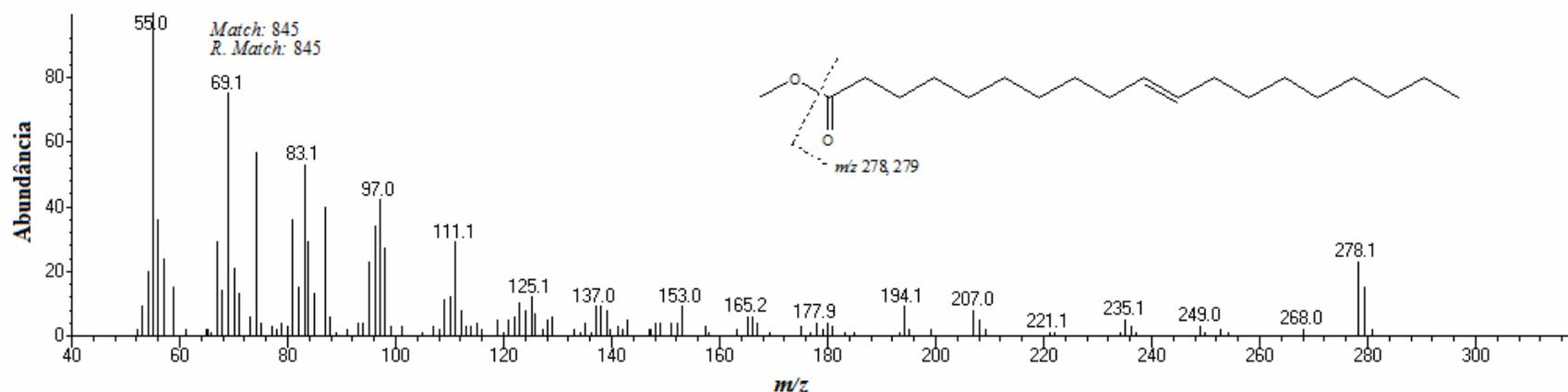


Figura 64 – Espectro de massas do composto **37** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (**15**), ácido nonadecanoico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**) como substrato.

O composto **37** apresentou o espectro de massas da **Figura 64**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 278 e 279 correspondentes a perda de uma molécula de CH_3OH , e um radical OCH_3 . Com base nisso sugeriu-se que o composto **37** seria o ácido 10-nonadecenoico detectado na forma de éster metílico.

Composto 38

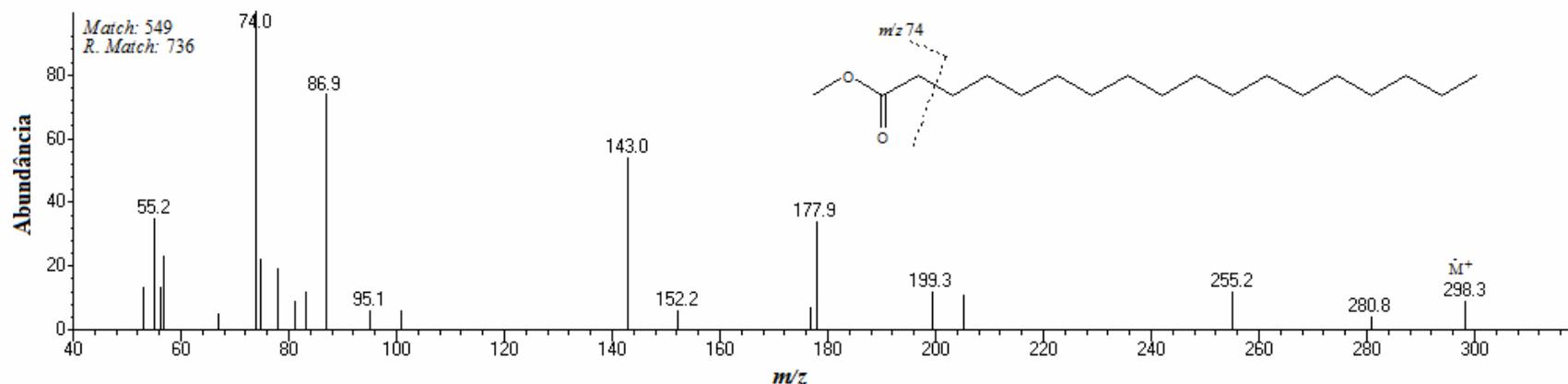


Figura 65 – Espectro de massas do composto **38** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (**15**), ácido nonadecanoico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**) como substrato.

O composto **38** apresentou o espectro de massas da **Figura 65**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 298 e 74 correspondentes ao íon molecular e perda do grupo éster. Com base nisso sugeriu-se que o composto **38** seria o ácido octadecanoico detectado na forma de éster metílico.

Composto 39

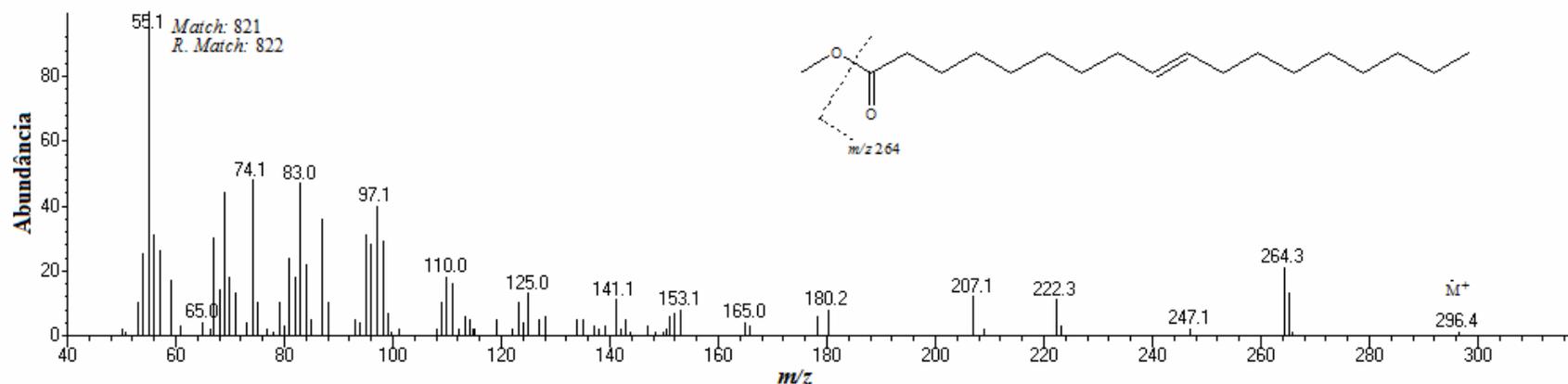


Figura 66 – Espectro de massas do composto **39** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**) como substrato.

O composto **39** apresentou o espectro de massas da **Figura 66**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 296, 264 e 265 correspondentes ao íon molecular, perda de uma molécula de CH_3OH e perda de radical OCH_3 . Com base nisso sugeriu-se que o composto **39** seria o ácido 9-octadecenóico detectado na forma de éster metílico.

Composto 40

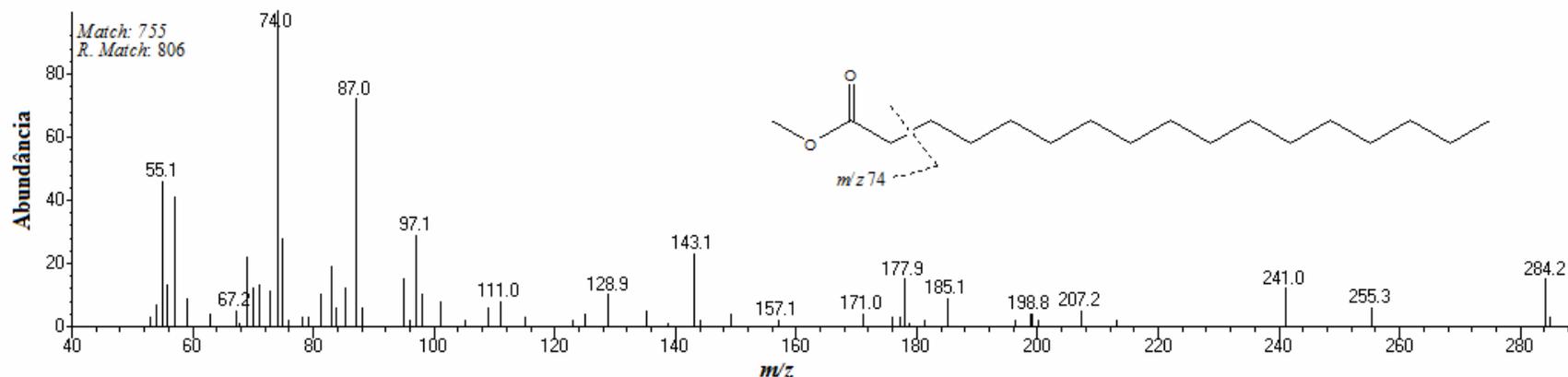


Figura 67 – Espectro de massas do composto **40** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**) como substrato.

O composto **40** apresentou o espectro de massas da **Figura 67**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 284 e 74 correspondentes ao íon molecular e perda do grupo éster. Com base nisso sugeriu-se que o composto **40** seria o ácido heptadecanóico detectado na forma de éster metílico.

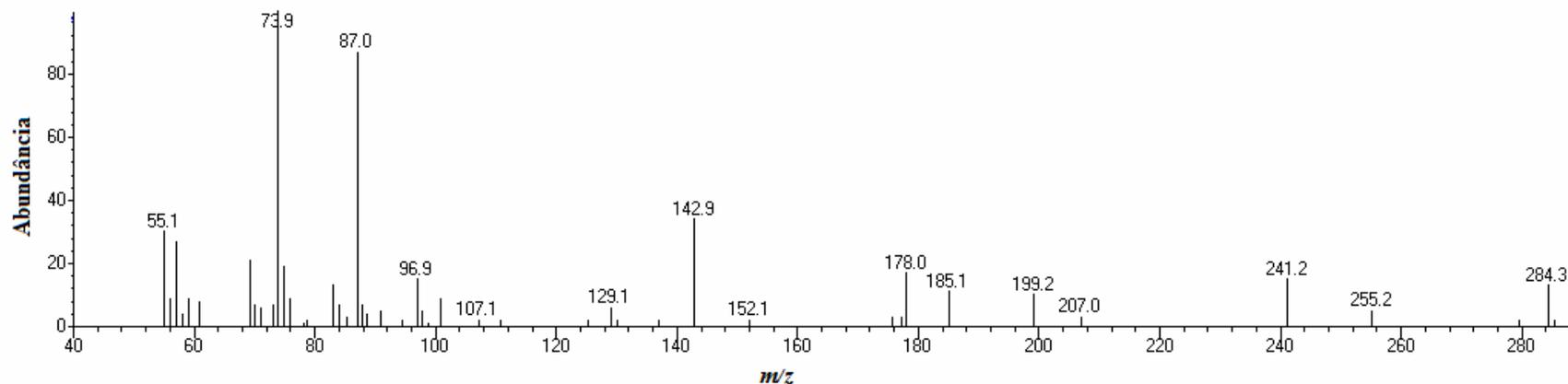
Composto 41

Figura 68 – Espectro de massas do composto **41** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**) como substrato.

O composto **41** apresentou o espectro de massas da **Figura 68**, onde podemos ver que é muito semelhante ao do composto **40**, porém eluiu em tempo de retenção diferente. Através do espectro podemos ver que também se trata de um ácido carboxílico (detectado na forma de éter), mas não foi possível atribuir nenhuma estrutura.

Composto 42

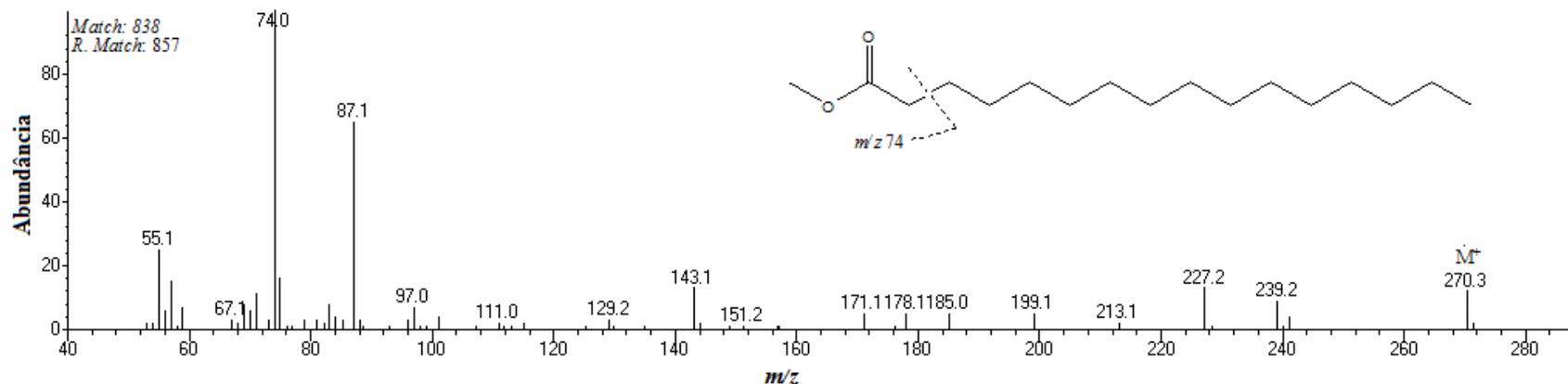


Figura 69 – Espectro de massas do composto **42** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (**15**), ácido nonadecanoico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**) como substrato.

O composto **42** apresentou o espectro de massas da **Figura 69**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 270 e 74 correspondentes ao íon molecular e perda do grupo éster. Com base nisso sugeriu-se que o composto **42** seria o ácido hexadecanoico detectado na forma de éster metílico.

Composto 43

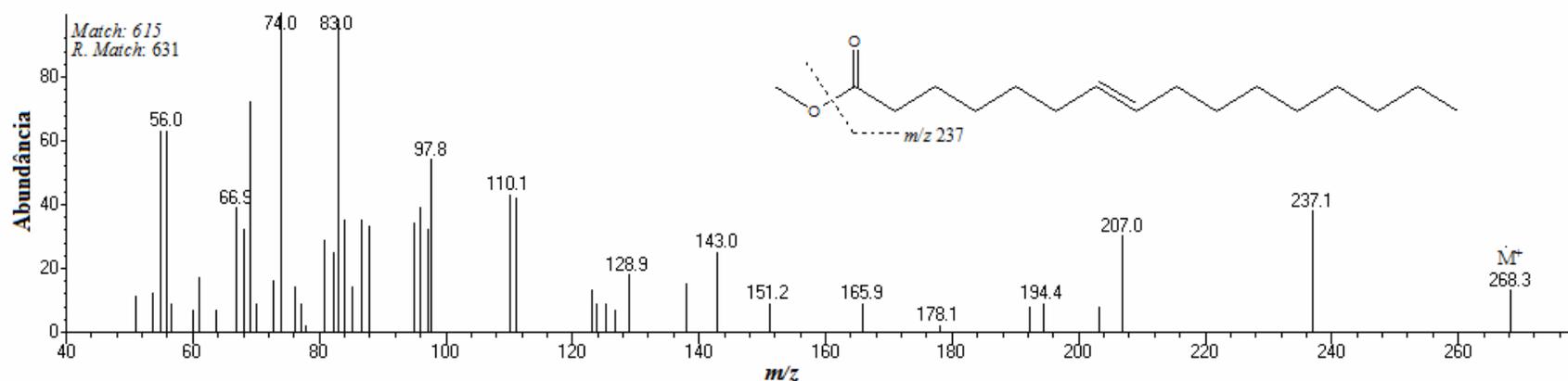


Figura 70 – Espectro de massas do composto **43** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**) como substrato.

O composto **43** apresentou o espectro de massas da **Figura 70**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 268 e 237 correspondentes ao íon molecular e perda de molécula de CH_3OH . Com base nisso sugeriu-se que o composto **43** seria o ácido 7-hexadecenóico detectado na forma de éster metílico.

Composto 44

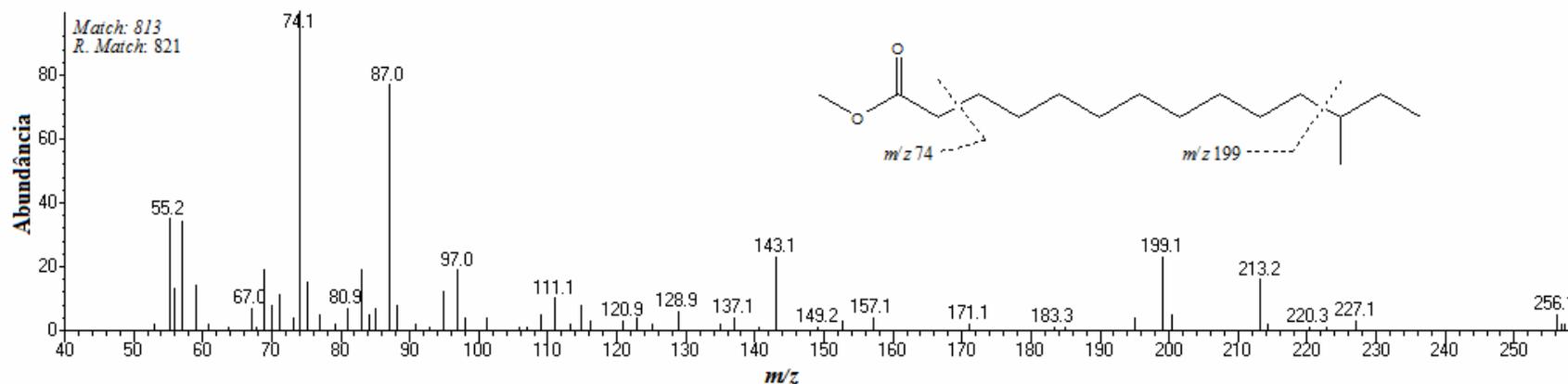


Figura 71 – Espectro de massas do composto **44** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**) como substrato.

O composto **44** apresentou o espectro de massas da **Figura 71**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 256, 199 e 74 correspondentes ao íon molecular, perda de parte da cadeia lateral e perda do grupo éster. Com base nisso sugeriu-se que o composto **44** seria o ácido 12-metil-tetradecanóico detectado na forma de éster metílico.

Composto 45

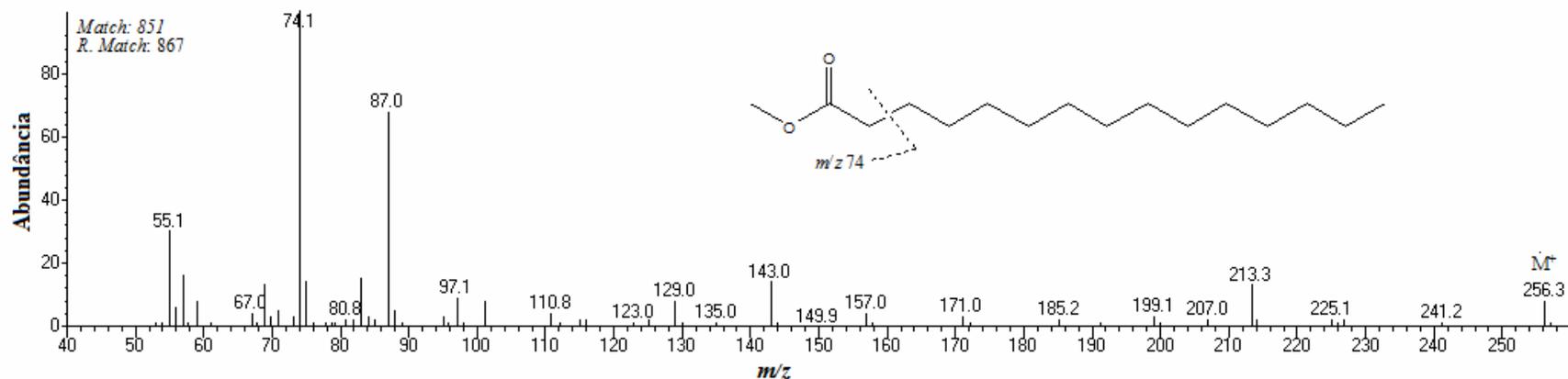


Figura 72 – Espectro de massas do composto **45** obtido do cromatograma de íons (CG/MS) da análise do extrato orgânico metilado após 14 dias de reação com a bactéria CFA 20 utilizando esqualano (**15**), ác. nonadecanóico (**14**), 4-colesten-3-ona (**16**) e fenantreno (**17**) como substrato.

O composto **45** apresentou o espectro de massas da **Figura 72**, onde podemos observar os íons fragmentos de m/z 256 e 74 correspondentes ao íon molecular e perda do grupo éster. Com base nisso sugeriu-se que o composto **45** seria o ácido pentadecanóico detectado na forma de éster metílico.