

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS MICROBIANOS PARA A
BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS CONTAMINADOS
POR PETRÓLEO E MISTURAS DE ÓLEO DIESEL/BIODIESEL**

José Evandro Saraiva Pereira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof^a. Dr^a Marilene Henning Vainstein

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Fátima Menezes Bento

Porto Alegre, dezembro de 2018.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e nos Laboratórios do Núcleo de Microbiologia Agrícola e Laboratório de Combustíveis, nesta Universidade. Para seu desenvolvimento, este trabalho contou com fomento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Ciências do Mar II. Número do processo: 88882.158705/2014-01).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Marilene Henning Vainstein, pela oportunidade, confiança e incentivo para a minha formação. Exemplo de que trabalho e esforço sempre compensam.

À minha co-orientadora, Professora Fátima Menezes Bento, pela confiança, oportunidade e ensinamentos durante esse percurso.

Ao professor, Alexandre Macedo, membro da comissão de acompanhamento.

Às professoras, Maria C. R. Peralba e Luciane M. P. Passaglia, por me receberem em seus laboratórios e por disponibilizarem toda a estrutura e espaço necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, Augusto Schrank, Charley C. Staats e Livia Kmetzsch os quais sempre se mostraram dispostos em ensinar e solucionar problemas e dúvidas no decorrer do trabalho em laboratório.

Ao Professor Luiz Antonio Mazzini Fontoura por estar sempre disposto a colaborar, pela parceria em trabalhos desenvolvidos, o qual contribuiu muito para o meu crescimento profissional.

À Dra. Adriana Ambrosini da Silveira por todo amor, incentivo, apoio, compreensão e acreditar na minha capacidade.

À colega e amiga, então doutoranda Amanda Pasinato Napp, que iniciou essa jornada comigo desde o primeiro dia e que sempre se mostrou preocupada e interessada, a qual foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, uma pessoa que admiro pela força de vontade e determinação.

Ao aluno de iniciação científica, Renê Gabriel pelo auxílio e comprometimento durante todo o transcorrer deste trabalho.

Às colegas então doutorandas, Sara Regina Allebrandt, Glaci Venturini Moro e Júlia Reuwsaat, também ao então doutorando, William Lopes, pelo companheirismo e por todos os ensinamentos, os quais foram imprescindíveis para meu crescimento profissional e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do PPGBCM, em especial para a Silvinha, pela disponibilidade e auxílio nas dúvidas que surgiam.

Aos colegas dos laboratórios 217, 219 e 220 pela convivência diária e profissionalismo e que, de alguma maneira, contribuíram e auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Alessandro Dallegrave pela parceria e disposição em colaborar nas resoluções, auxiliando no desenvolvimento deste trabalho.

A Transpetro e ao Sr. Deivid Pereira por terem fornecido as amostras de petróleo, muito obrigado.

Ao Sr. Marcos por nos permitir acessar a Plataforma de Salinas e coletar as amostras de água do mar, muito obrigado.

Aos meus pais, Galvão e Marli Saraiva Pereira, aos meus irmãos Elesandro, Ezequiel, Rodrigo e Claudione, ao meu amigo e irmão Jorge e sua esposa Zélia Passos e aos meus tios Silvio e Luzia, pelo apoio necessário ao longo de toda a minha vida, sempre acreditaram nas minhas escolhas, sem os quais nenhuma das minhas conquistas seriam possíveis.

Ao amigo Sr. Jeferson Jardim Gonsalves (In memória) pelo apoio, crédito e que sempre acreditou que esta conquista seria possível.

Aos meus amigos e colegas da CSE - Ala "A", Tatiane Pinheiro, Jair Cordeiro, João Fabian, Everson Costa, João Agnaldo e Carla Maia, que sempre me incentivaram mesmo quando as condições não eram favoráveis.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de realização do ensino superior de qualidade;

À agência de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

*“In life, there is nothing to fear,
but to understand.”*

*Marie Curie
The Nobel Prize in Physics
(1903) and Chemistry (1911).*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 Visão geral dos derramamentos de petróleo no ambiente marinho.....	16
1.2 Efeitos dos derramamentos de petróleo no ambiente marinho.....	22
1.2.1 Impactos na saúde humana em decorrência aos derramamentos de petróleo.....	24
1.3 Composição química do petróleo	25
1.4 Destino do petróleo após o derramamento no ambiente marinho	28
1.4.1 Remediação de ambientes marinhos devido a derramamentos de petróleo.....	29
1.5 Biorremediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.....	30
1.5.1 Potencial genético e vias metabólicas de biodegradação aeróbica dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs	33
1.5.1.1 Estrutura química do contaminante	41
1.5.1.1.1 Efeito estérico.....	41
1.5.1.1.2 Efeito Eletrônico.....	42
1.5.2 Fatores que influenciam na biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo.....	43
1.5.2.1 Produção de biossurfactantes.....	44
1.5.2.2 Efeito da temperatura na biodegradação	49
1.5.2.3 Efeito do pH na biodegradação	50
1.5.2.4 Efeito do oxigênio na biodegradação	51
1.5.2.5 Efeito de nutrientes e razão estequiométrica de C:N:P na biodegradação	51
1.5.2.6 Efeito da salinidade na biodegradação	52
1.6 Estrutura da tese	54
2. Capítulo I: Biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos em água do mar por microrganismos autóctones.....	55
2.1 OBJETIVOS	56
2.1.1 Objetivos específicos	56
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57

2.2.1 Amostras de água do mar e petróleo	57
2.2.2 Bioprospecção das amostras para o isolamento dos microrganismos.....	57
2.2.3 Isolamento dos microrganismos.....	58
2.2.4 Testes preliminares para a avaliação do potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo pelos microrganismos	59
2.2.4.1 Pré-inóculo e esgotamento das reservas energéticas	59
2.2.4.2 Indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	60
2.2.4.3 Produção de biossurfactantes.....	60
2.2.4.4 Capacidade do microrganismo de acessar a fonte de carbono em meio sólido... 61	
2.2.5 Identificação molecular dos microrganismos selecionados	61
2.2.6 Extração dos hidrocarbonetos alifáticos do petróleo Bazu	63
2.2.6.1 Limpeza da vidraria	63
2.2.6.2 Cromatografia líquida preparativa.....	64
2.2.7 Testes de biodegradação dos hidrocarbonetos	65
2.2.8 Ensaio do desenvolvimento bacteriano	65
2.2.9 Monitoramento do desenvolvimento bacteriano em tempo real	66
2.2.10 Determinação das medidas de tensão superficial, índice de emulsificação e pH	67
2.2.11 Identificação molecular dos biossurfactantes	67
2.2.12 Determinação da biodegradação e teste de recuperação dos hidrocarbonetos	68
2.2.12.1 Extração dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs dos meios de cultivo.....	68
2.2.12.2 Determinação dos percentuais de biodegradação	69
2.2.12.3 Teste de recuperação dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs	70
2.2.13 Análise estatística	71
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
2.3.1 Isolamento dos microrganismos com potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo	72
2.3.2 Seleção dos microrganismos.....	73
2.3.3 Identificação molecular dos microrganismos selecionados	76
2.3.4 Extração e composição dos hidrocarbonetos saturados do petróleo Bazu.....	77
2.3.5 Avaliação do desenvolvimento microbiano durante o metabolismo dos contaminantes.....	81
2.3.6 Identificação dos biossurfactantes.....	88
2.3.6.1 Lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus methylotrophicus</i>	88

2.3.6.2	Glicolipídios produzidos por <i>Pseudomonas sihuiensis</i>	89
2.3.7	Determinação da tensão superficial, índice de emulsificação e pH	91
2.3.8	Determinação da eficiência dos microrganismos na biodegradação dos contaminantes em água do mar	95
2.3.8.1	Biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos	95
2.3.8.2	Biodegradação dos PAHs	99
3.	Capítulo II: Síntese de padrões internos para o desenvolvimento e validação de metodologia analítica por GC-FID para a determinação do teor de ésteres metílicos ou etílicos a partir de matérias-primas convencionais e não convencionais.....	104
3.1	INTRODUÇÃO	105
3.2	OBJETIVOS	110
3.2.1	Objetivos específicos	110
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	111
3.3.1	Síntese dos ésteres.....	111
3.3.2	Caracterização dos ésteres de hexadecila.....	111
3.3.3	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	111
3.3.4	Análise Termogravimétrica.....	112
3.3.5	Teor de pureza dos ésteres	112
3.3.6	Teste de seletividade	113
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
3.4.1	Isomeria de posição dos ésteres	115
3.4.2	Testes de seletividade dos ésteres	116
3.4.3	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier dos ésteres.....	119
3.4.4	Análise termogravimétrica dos ésteres.....	121
3.4.5	Teor de pureza dos ésteres	122
4.	Capítulo III: Development and validation of analytical methodology by GC-FID using hexadecyl propanoate as an internal standard to determine the bovine tallow methyl esters content.....	124
5.	DISCUSSÃO GERAL	144
6.	CONCLUSÃO GERAL.....	153
7.	PERSPECTIVAS	154
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155

9. APÊNDICES	172
10. CURRICULUM VITAE RESUMIDO	189

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ATR	Refletância total atenuada, do inglês - <i>Attenuated Total Reflectance</i>
BH	Bushnell-Haas
BHD	Butanoato de hexadecila
C14:0	Tetradecanoato de metila
C17:0	Heptadecanoato de metila
C19:0	Nonadecanoato de metila
C24:1	Metil- <i>cis</i> -15-tetracosenoato
C6:0	Hexanoato de metila
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chamas, do inglês - <i>Gas Chromatography – Flame Ionization Detector</i>
EHD	Etanoato de hexadecila
HME	Heptadecanoato de metila
IE	Índice de Emulsificação
m/v	Massa por volume
mN/m	MiliNewton por metro
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica, do inglês - <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDM	Nonadecanoato de metila
PAH	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos, do inglês - <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

pH	Potencial de hidrogênio iônico
PHD	Propanoato de hexadecila
pmol	Picomol
rpm	Rotação por minuto
TGA	Análise Termogravimétrica, do inglês – <i>Thermogravimetric Analysis</i>
t_r	Tempo de retenção
TRANSPETRO	<i>Petrobras Transporte S.A</i>
TS	Tensão Superficial
UCM	Mistura complexa não resolvida
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
PNLP	Parque Nacional da Lagoa do Peixe
S	Sedimento
SAM	Sedimento e água do mar
AM	Água do mar
p/v	Peso por volume
v/v	Volume por volume
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados formados por: adenina, citosina, guanina e timina.
Q-TOF-MS	Espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo, do inglês – <i>Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
ppm	Partes por milhão
kgf/cm²	Quilograma-força por centímetro quadrado
HA	Hidrocarboneto alifático

m/z	Razão massa carga
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
bar	Unidade de pressão. Um bar equivale a 0,9869 atm

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição e diferentes classes mais representativas dos hidrocarbonetos que compõem o petróleo.....	27
Figura 2. Modelo da via metabólica, localização, função do operon e produtos do gene <i>Alk</i> durante a biodegradação dos alcanos.....	36
Figura 3. Modelo da via metabólica para a biodegradação de alcanos por oxidação terminal e subterminal.....	37
Figura 4. Modelo da via β -cetoacil-CoA e dioxigenases de clivagem em anel benzeno.....	40
Figura 5. Estrutura química de dois compostos orgânicos.....	42
Figura 6. Efeito dos grupos doadores e aceptores de elétrons na estrutura química do contaminante verso a taxa de biodegradação.	43
Figura 7. Representação esquemática do mecanismo adotado por <i>Bacillus licheniformis</i> MTCC 5514 para biodegradar antraceno na presença de produção in situ de biosurfactantes e enzimas mono e dioxigenase.....	47
Figura 8. Localização dos pontos de bioprospecção no Parque Nacional da Lagoa do Peixe.....	58
Figura 9. Perfil cromatográfico da fração de hidrocarbonetos alifáticos extraídos do petróleo Bazu.....	80
Figura 10. Desenvolvimento de <i>B. methylotrophicus</i> (A), <i>P. sihuiensis</i> (B) e <i>A. polymorphus</i> (C) em meio BH com petróleo.....	84
Figura 11. Desenvolvimento de <i>B. methylotrophicus</i> (A), <i>P. sihuiensis</i> (B) e <i>A. polymorphus</i> (C) em meio BH com PAHs.....	85
Figura 12 A e A`. Desenvolvimento celular das diferentes linhagens de <i>B. methylotrophicus</i> , <i>P. sihuiensis</i> e <i>A. polymorphus</i> em água do mar contaminada por hidrocarbonetos de petróleo.....	87
Figura 13. Porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos com 0,1 % (m/v) após 46 dias de incubação em água do mar a 30 °C e 200 rpm.....	98
Figura 14. Porcentagem de degradação em água do mar contaminada com uma mistura (equivalente) de naftaleno, antraceno, fenantreno e pireno, totalizando 0,1 % (m/v), após 46 dias de incubação a 30 °C e 200 rpm.....	102
Figura 15. Estruturas químicas dos ésteres, e em destaque, o grupo éster.....	116
Figura 16. Perfis cromatográficos dos principais ésteres do biodiesel de gordura bovina (A e B), na faixa de tempo de retenção de 8 a 13 min.....	118
Figura 17. Espectros no infravermelho na região de número de onda de 4000 a 650 cm^{-1}	120
Figura 18. Curvas das análises termogravimétricas dos ésteres graxos demonstrando o comportamento de perda de massa com os seus respectivos resíduos.....	122

RESUMO

A exploração, produção, armazenamento e transporte de petróleo no ambiente marinho representam risco constante de derramamentos e grave ameaça ambiental. Devido à composição complexa, o petróleo apresenta potencial mutagênico e carcinogênico, além de outras propriedades tóxicas, como bioacumulação e biomagnificação. Para mitigar os impactos ambientais, a utilização de estratégias apropriadas, como a biorremediação, tem se destacado na resposta a derramamentos de petróleo no ambiente. Tal processo utiliza microrganismos especializados, os quais removem os contaminantes ambientais devido a propriedades metabólicas específicas dos mesmos. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi realizar a prospecção, isolar, identificar e caracterizar microrganismos autóctones com potencial de biorremediar ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Para isto, um total de 25 microrganismos foram isolados de amostras coletadas no Parque Nacional da Lagoa do Peixe, local com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. Foram realizados testes preliminares e identificação molecular com tais isolados, resultando na seleção de três bactérias: *Bacillus methylotrophicus*, *Pseudomonas sihuiensis* e *Ancylobacter polymorphus*. Após, estudos de biodegradação foram realizados a fim de avaliar a capacidade dos microrganismos selecionados em biodegradar os contaminantes (hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos policíclicos). Os dados mostraram que as bactérias foram capazes de biodegradar: (i) até 92,1 e 42,4 % da fração alifática de cadeia média (C8 a C19) e de cadeia longa (C20 a C33), respectivamente; (ii) 31,1 % do isoprenóide (pristano) e (iii) 46 % de antraceno. Apenas *B. methylotrophicus* e *P. sihuiensis* mostraram capacidade de biodegradar fenantreno (33,9 %) e pireno (35,3 %). Somado a isso, foi investigada a produção de biosurfactantes por tais bactérias. As análises demonstraram a produção de surfactinas, iturinas, mono e di-ramnolípideos, os quais reduziram a tensão superficial e mostraram atividade emulsificante. Desta forma, os resultados deste primeiro capítulo demonstraram o potencial uso dos microrganismos, selecionados no estudo, para a biorremediação de ambientes marinhos expostos ao petróleo, buscando redução de impactos ambientais.

A presente pesquisa também demonstra, nos capítulos II e III, os resultados referentes à síntese de ésteres graxos a partir de álcool de cadeia longa com ácidos carboxílicos de cadeia curta (etanoato, propanoato e butanoato de hexadecila), com teor de pureza final ≥ 99 %. O método desenvolvido por GC-FID, com propanoato de hexadecila como padrão interno, foi avaliado e apresentou boa seletividade, resolução, exatidão, repetitividade, precisão intermediária e robustez. Além disso, as condições de operação cromatográficas apropriadas reduziram (i) o tempo de análise em 26,1 % e (ii) a concentração do padrão interno para 80 %. Assim, tais avaliações realizadas otimizaram o processo de análise de amostras de biodiesel, em relação ao uso do padrão interno (propanoato de hexadecila), uma vez que, quando comparado a EN 14103:2011, é possível aumentar em 5 vezes o número de análises utilizando tal processo.

ABSTRACT

The exploration, production, storage and transportation of petroleum on marine environment represents a constant risk of spills and a serious environmental threat. Due to its complex composition, petroleum has mutagenic and carcinogenic potential as well as other toxic properties, such as bioaccumulation and biomagnification. To mitigate environmental impacts, the use of appropriate strategies, such as bioremediation, has been highlighted in response to petroleum spills in the environment. This process uses specialized microorganisms, which remove environmental contaminants due to their specific metabolic properties. In this context, the aim of the present research was to prospect, isolate, identify and characterize autochthonous microorganisms with potential for bioremediation of marine environments contaminated by petroleum hydrocarbons. For this, a total of 25 microorganisms were isolated from samples collected in Lagoa do Peixe National Park, a historical site of petroleum hydrocarbon contamination. Preliminary tests and molecular identification were performed with these isolates, resulting in selection of three bacteria: *Bacillus methylotrophicus*, *Pseudomonas sihuiensis* and *Ancylobacter polymorphus*. After, biodegradation studies were performed to evaluate the ability of selected microorganisms to biodegrade the contaminants (aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons). The results show that bacteria were able to biodegrade: (i) up to 92.1 and 42.4 % of the medium (C8 to C19) and long (C20 to C33) chain aliphatic contaminant fraction, respectively; (ii) 31.1 % of isoprenoid (pristane) and (iii) 46 % of anthracene. Only *B. methylotrophicus* and *P. sihuiensis* showed phenanthrene (33.9 %) and pyrene (35.3 %) biodegradation ability. Added to this, biosurfactants production by selected bacteria was investigated. Analysis demonstrated the production of surfactins, iturins, mono- and di-rhamnolipids, which reduced the surface tension and showed emulsifying activity. Thus, results showed, in the first chapter, demonstrate the potential use of the selected microorganisms for bioremediation of marine environments exposed to petroleum, aiming to reduce environmental impacts. The present research also demonstrate, in Chapters II and III, the results obtained for fatty esters synthesis from long chain alcohol with short chain carboxylic acids (ethanoate, propanoate and hexadecyl butanoate), with ≥ 99 % as final purity content. The method developed by GC-FID, with hexadecyl propanoate as internal standard, was evaluated and showed good selectivity, resolution, trueness, repeatability, intermediate precision and robustness. In addition, the appropriate chromatographic operating conditions reduced (i) analysis time by 26.1 % and (ii) internal standard concentration to 80 %. Thus, these evaluations optimized the process of biodiesel samples analysis, in relation to the use of internal standard (hexadecyl propanoate), since, in comparison to EN 14103:2011, it is possible to increase 5 times the number of analysis when such process is performed.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Visão geral dos derramamentos de petróleo no ambiente marinho

O crescimento econômico global tem possibilitado que a demanda por bens de consumo e serviços se torne cada vez maior, assim como a necessidade da sociedade moderna por energia. À medida que as fontes de recursos naturais terrestres se tornam gradualmente escassas, as localizadas nos oceanos estão atraindo maior interesse. As fontes de energia fósseis não renováveis, como o petróleo no mar profundo, constituem-se na primeira opção. O petróleo e gás natural são os principais recursos que fornecem energia às sociedades industrializadas (BOLLMANN *et al.*, 2010; AFENYO *et al.*, 2017; HEIN, 2018; MAHJOUBI *et al.*, 2018).

Os países industrializados são quase totalmente dependentes dos combustíveis fósseis, e o consumo de energia em todo o mundo aumentou cerca de 70 % nas últimas três décadas (IEA, 2018). A Agência Internacional de Energia (IEA) estima que o consumo aumentará 50 % até 2030 e os maiores consumidores são os EUA, a China e a Rússia. A demanda por energia continuará aumentando e os preços crescentes estimularão o interesse pelas jazidas de petróleo e gás nas profundezas dos oceanos, antes consideradas muito onerosas para serem extraídas (HEIN, 2018; IEA, 2018). A petroquímica é um dos principais impulsionadores pela variedade de produtos químicos derivados do petróleo e do gás natural, os quais são cruciais para a fabricação de muitos produtos que satisfazem essa demanda crescente. Como exemplos, incluem itens de cuidados pessoais, conservantes de alimentos, fertilizantes, móveis, tintas e lubrificantes para fins automotivos e industriais (IEA, 2018; LEVI & CULLEN, 2018; MAHJOUBI *et al.*, 2018).

Atualmente, as reservas convencionais de petróleo que podem ser utilizadas de forma fácil e acessível usando a tecnologia disponível são estimadas em 157 bilhões de toneladas. Deste montante, 26 % (41 bilhões de toneladas) são encontrados em áreas *offshore* (estruturas localizadas em alto mar para a extração de petróleo no oceano). Em 2007, 1,4 bilhões de toneladas de petróleo, o equivalente a cerca de 37 % da produção anual de petróleo, foram extraídas dos oceanos. As áreas mais produtivas são atualmente o Mar do Norte e o Golfo do México, o Oceano Atlântico na extensa costa do Brasil e da África Ocidental, no Golfo Pérsico e os mares ao largo do Sudeste Asiático (BOLLMANN *et al.*, 2010; IEA, 2018). A indústria do petróleo frequentemente cobra um pesado tributo ao ambiente marinho, costeiro e de mangue. Estes ambientes são comumente afetados por acidentes envolvendo a indústria do petróleo, tornando esses ecossistemas particularmente sensíveis à poluição por petróleo (NARDELI *et al.*, 2016; MAHJOUBI *et al.*, 2018). A poluição por petróleo é uma das formas mais visíveis e danosas aos ecossistemas marinhos.

A história mundial testemunhou um grande número de derramamentos de petróleo, alguns deles levaram a impactos devastadores. Uma das formas que o petróleo contamina os mares é como resultado de grandes desastres de petroleiros. Os petroleiros estão transportando entre 50 % e 60 % de todo o petróleo bruto da produção mundial. Essas enormes quantidades de petróleo representam uma fonte de desenvolvimento econômico global, ao mesmo tempo em que representam uma ameaça para o meio ambiente marinho e costeiro (VIDMAR & PERKOVIČ, 2018). Entre os acidentes estão associadas as falhas de equipamentos ou por erros humanos que dão origem aos riscos de incidentes catastróficos. Erros humanos estão por trás de pelo menos 80 % ou mais dos acidentes com petroleiros. Tais erros incluem fadiga, causada por excesso de trabalho, perícias inadequadas nas embarcações, má comunicação ou o uso de cartas de navegação desatualizadas, além de

violação dos protocolos de navegação e códigos de vigilância. No entanto, raramente são listadas como causas em bancos de dados de acidentes de transporte (MICHEL & FINGAS, 2016; SHAPIRO, 2017; CHEN *et al.*, 2018; TANG *et al.*, 2018; WAN & CHEN, 2018). Não são apenas os desastres de petroleiros que propiciam a poluição no ambiente marinho, mas também, por fontes difusas, como vazamentos durante a extração de petróleo, operações ilegais de limpeza de tanques ou descargas (GRIFFITHS, 2012).

Os desastres associados à extração, refino, transporte e estocagem de petróleo se tornaram aparentes desde a década de 1960 até hoje, quando os primeiros petroleiros entraram em serviço, aumentando o potencial de acidentes ao meio ambiente marinho (ATLAS & HAZEN, 2011; AL-HAWASH *et al.*, 2018; MAHJOUBI *et al.*, 2018; WAN & CHEN, 2018). Foi então que o mundo testemunhou seus primeiros grandes derramamentos de petróleo. A Tabela 1 apresenta um resumo dos acidentes de derramamento de petróleo no ambiente marinho documentados até o momento. O primeiro desses desastres ocorreu em 1967, quando o petroleiro Torrey Canyon derramou 119.000 toneladas de petróleo perto das Ilhas Scilly, no sudoeste da Inglaterra. O petróleo formou uma mancha de cerca de 1000 quilômetros quadrados e causou uma poluição maciça nas costas de Cornwall, Guernsey, nas Ilhas do Canal, e na França (SIMPSON, 1968; MORGAN, 1990; ATLAS, 1991). Em março de 1989, o petroleiro Exxon Valdez, encalhou em Prince William Sound, no Golfo do Alasca, derramando petróleo (37.000 toneladas) ao longo de 2000 quilômetros de costa que incluía vários santuários de aves e reservas naturais. Até hoje, algumas áreas ainda estão contaminadas com resíduos de petróleo, que se degradaram muito lentamente nas baixas temperaturas do Alasca (MORGAN, 1990; ATLAS, 1991; PETERSON *et al.*, 2003).

Tabela 1. Principais derramamentos de petróleo no ambiente marinho desde 1967.

Petroleiro/Plataforma /Costa	Ano	Localização	Derramamento (10³) toneladas
Torrey Canyon	1967	Ilhas Scilly, Reino Unido	119
Sea Star	1972	Golfo de Omã	115
Jakob Maersk	1975	O porto, Portugal	88
Urquiola	1976	Corunha, Espanha	100
Hawaiian Patriot	1977	300 milhas náuticas ao largo Honolulu	95
Amoco Cadiz	1978	Bretanha, França	223
Atlantic Empress	1979	Tobago, Índias Ocidentais	287
Independenta	1979	Bosphorus, Turquia	95
Irenes Serenade	1980	Baía de Navarino, Grécia	100
Castillo de Bellver	1983	Baía de Saldanha, África do Sul	252
NOVA	1985	Ilha de Kharg, Golfo do Irã	70
Odyssey	1988	Nova Escócia, Canadá	132
Khark 5	1989	Costa Atlântica de Marrocos	70
Exxon Valdez	1989	Prince William no Golfo do Alasca, EUA	37
ABT Summer	1991	700 milhas náuticas, Angola	260
Haven	1991	Génova, Itália	144
Aegean Sea	1992	Corunha, Espanha	74
Katina P.	1992	Maputo, Moçambique	72
Braer	1993	Ilhas Shetland, Reino Unido	85
Sea Empress	1996	Milford Haven, Reino Unido	72
Manguinhos refinery	2001	Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil	0,10
Petrobras 36	2001	Roncador, Bacia de Campos, Brasil	0,27
Jessica	2001	Ilhas Galápagos, Equador	0,57
Prestige	2002	Fora da costa espanhola	77
MV Selendang Ayu	2004	Ilha de Unalaska, Alasca, EUA	1,6
Hebei Spirit	2007	Coreia do Sul	11
Korea oil spill	2007	Mar Amarelo, Coreia do Sul	11
Statfjord oil spill	2007	Mar da Noruega, Noruega	4
ExxonMobil	2010	Delta do Níger, Nigéria	95
Deepwater Horizon	2010	Golfo do México, EUA	700
Campos Basin	2011	Campo de Frade, Brasil	0,4
Rayong oil spill	2013	Golfo da Tailândia, Tailândia	0,2
Refugio oil spill	2015	Califórnia, praia, EUA	0,3
Delta House oil spill	2017	Golfo do México, Louisiana, EUA	1,3
Agia Zoni II	2017	Golfo Sarónico, Salamina, Grécia	2,5
Sanchi	2018	Mar da China Oriental, China	100

Fonte: Adaptado de: SAADOUN & AL-GHZAWI, 2005; SAADOUN, 2015; MICHEL & FINGAS, 2016; ITOPI, 2017; WAN & CHEN, 2018.

Em 7 de dezembro de 2007, uma barcaça de guindaste colidiu no petroleiro Hebei Spirit próximo ao Taeanhaean National Park na Coreia do Sul. O petroleiro submergiu e derramou 11.000 toneladas de petróleo, sendo que em horas, a mancha de óleo tinha muitos quilômetros de comprimento (ITOPF, 2017). A explosão no poço de perfuração Deepwater Horizon em 20 de abril de 2010 causou o maior vazamento acidental na história da indústria de petróleo, liberando cerca de 700.000 toneladas de petróleo no Golfo do México (BARRON, 2011; FISHER *et al.*, 2016). Apenas o vazamento da Guerra do Golfo do Kuwait em 1990 liberou mais petróleo para o ambiente marinho (ATLAS, 1991; WATT, 1994). No entanto, o acidente da Deepwater Horizon não é sem precedentes. Em 1979, uma explosão na plataforma de Ixtoc I na Baía de Campeche no Golfo do México, resultou no derramamento de petróleo do fundo do mar por mais de 9 meses e, no total, cerca de meio milhão de toneladas de petróleo foram liberados (JERNELOV, 2010). Em 2011, na Bacia de Campos a plataforma de petróleo operada pela Chevron Brasil, derramou um total de 5.943 L de petróleo, cobrindo uma área 163 km² no oceano (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Segundo a ITOPF, em 2017 foram registrados outros derramamentos de petróleo. O primeiro grande derramamento ocorreu em junho, quando um petroleiro afundou no Oceano Índico com mais de 5.000 toneladas de petróleo. O segundo incidente envolveu um navio-tanque que afundou na costa da Grécia em setembro, espalhando cerca de 700 toneladas de petróleo. Neste mesmo ano ocorreram mais quatro derramamentos (médios = 7 a 700 toneladas) de combustível que estavam a bordo de navios. Dois foram registrados no sul e sudeste da Ásia, ambos resultados de colisões. Um terceiro derramamento foi relatado no leste da Ásia em agosto e o quarto ocorreu em outubro nos Estados Unidos (ITOPF, 2017). Mais recentemente, em janeiro de 2018, o petroleiro iraniano, o Sanchi, colidiu com um

navio de carga no Mar da China Oriental, derramando mais de 100,000 toneladas de produtos petrolíferos (WAN & CHEN, 2018).

Além dos inúmeros derramamentos de petróleo ocorridos até o momento, o ambiente marinho único e sensível do Ártico está sob grande ameaça. A possibilidade de uma grande catástrofe ambiental nas áreas marinhas nas regiões do Ártico e do Atlântico Norte tornou-se uma questão de preocupação global. Atividades crescentes na exploração de petróleo e gás (operação de perfuração, transporte de oleodutos e movimentação de navios), levou os governos dos países do Ártico, a Organização Marítima Internacional (IMO) e outras partes interessadas, a rever os regulamentos existentes destinados a combater a poluição marinha. Atualmente, não há meios eficazes de coletar o petróleo de águas geladas, e o petróleo se decompõe lentamente em ambientes frios. Portanto, os efeitos do petróleo derramado em áreas marinhas do Ártico são susceptíveis de serem inevitáveis e prolongados (CHANG *et al.*, 2014; AFENYO *et al.*, 2016 e 2017).

A indústria do biodiesel no mundo ainda é jovem e pequena em comparação com a indústria do petróleo. O biodiesel é considerado um combustível composto de alquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou gorduras animais (ANP, 2018). No Brasil, em março de 2018, o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) aprovou o aumento de 10 % de biodiesel (B10) na mistura com o óleo diesel para ser comercializado em todo território nacional. Isto corresponderá a 6 bilhões de litros de biodiesel. Neste mesmo ano, em outubro, a cadeia produtiva juntamente com o CNPE, iniciaram as negociações e estão projetando o B15 para o início de 2019. Este acréscimo de 5 % resultará em 11,5 bilhões de litros de biodiesel (ANP, 2018).

Na Argentina, a mistura de biodiesel ao diesel é de 10 %, obrigatório. Entretanto, a produção de biodiesel, além de atender o mercado interno, também é voltada, desde 2008,

para o mercado externo, como a União Europeia, os Estados Unidos da América e norte da África (LAMERS *et al.*, 2008; FEDERAL REGISTER, 2015; USDA-FAS, 2015; USDA-FAZ, 2018). Em 2015, segundo um boletim da Bolsa de Comércio de Rosário, a indústria argentina de biodiesel exportou 788 mil toneladas. Em 2016, o volume aumentou para 1.349.000 toneladas, dos quais 89 % foram enviadas para os Estados Unidos. Em 2016, a Malásia também exportou 65 % de biodiesel para a Espanha, 19 % para a Holanda e 11 % para a Suíça. Somente a Argentina e a Indonésia exportaram, respectivamente, 886.000 toneladas e 27.000 toneladas de biodiesel para a União Europeia entre outubro de 2017 e março de 2018 (USDA-FAS, 2018).

Todo este biocombustível é transportado pelo mar em petroleiros. Apesar de ser considerado geralmente combustível limpo, o biodiesel pode ser prejudicial ao meio ambiente. Ele se decompõe facilmente para gerar ácidos graxos livres e metanol após o derramamento. Derramamentos de biodiesel tendem a se espalhar e formam uma camada espessa, de cor clara sobre a água do mar (KHOURY *et al.*, 2011).

1.2 Efeitos dos derramamentos de petróleo no ambiente marinho

Qualquer derramamento de petróleo é desastroso, seja ecológica, econômica e socialmente. Os derramamentos de petróleo geram desastres ambientais de impactos negativos imediatos e de longo prazo no meio ambiente, que podem durar décadas. A disseminação, o destino e o impacto do petróleo derramado em diferentes habitats diferem, com o derramamento marítimo tendo o potencial de impactar grandes áreas e recursos longe do local do derramamento, enquanto o derramamento terrestre é geralmente confinado a áreas limitadas (TROISI *et al.*, 2016; MEARNES *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2018).

Sufocamento e toxicidade apresentam os maiores riscos para a biota costeira, e a persistência de óleos pesados pode prolongar a ameaça (ARULAZHAGAN *et al.*, 2010; ALMEDA *et al.*, 2013). Os produtos petrolíferos apresentam toxicidade significativa para organismos aquáticos, desde toxicidade aguda grave por hidrocarbonetos de cadeia curta mais voláteis até toxicidade crônica resultante da exposição prolongada a hidrocarbonetos de cadeia longa que persistem no topo ou são absorvidos pelos sedimentos (BARRON, 2011; SILVA *et al.*, 2016; TURNER & RENEGAR, 2017). A penetração de petróleo no substrato pode promover a persistência do óleo, aumentar a dificuldade de remoção e reduzir a eficiência do processo de biodegradação. Além disso, um processo conhecido como relubrificação crônica, que é a liberação subsequente de óleo que é absorvido no sedimento ao longo de meses ou anos, pode persistir ainda mais no ambiente por longos períodos de tempo (FISHER *et al.*, 2016).

Os derramamentos de petróleo também demonstraram ter um impacto significativo na ecologia dos ambientes marinhos. Além de resultar na mortalidade ou morbidade em massa de organismos particularmente sensíveis, os derramamentos de petróleo podem permitir que outros organismos menos sensíveis se desenvolvam devido à remoção da competição, resultando em um deslocamento de fase persistente do sistema (BARRON, 2011). Experiências com caranguejos e mexilhões mostraram que principalmente os processos metabólicos e de crescimento são prejudicados (BARRON, 2011; SILVA *et al.*, 2016).

Pesquisas que investigam os efeitos do petróleo derramado sobre os corais indicam que a energia investida na recuperação de eventos de petróleo reduz a energia disponível para funções vitais, como crescimento e reprodução do esqueleto. Os corais apoiam um ecossistema diverso que é fundamental para a saúde dos oceanos. Cientistas frequentemente descrevem as comunidades de corais como “*idades submarinas*” ou “*florestas tropicais*”

do mar” (DOS SANTOS *et al.*, 2015; GALFORD *et al.*, 2018; WILSON & FORSYTH, 2018). Comunidades saudáveis de corais fornecem alimento, abrigo e habitat a milhares de criaturas, desde pequenos plânctons a crustáceos, moluscos, peixes e répteis maiores, mamíferos e até pássaros. Os seres humanos também dependem de comunidades saudáveis de corais para fontes de remédios, alimentos, subsistência e recreação. (FISHER *et al.*, 2014). No caso dos corais, o número de descendentes diminui em áreas cronicamente contaminadas com petróleo (NOAA, 2001; ETNOYER *et al.*, 2015; TURNER & RENEGAR, 2017).

Além disso, muitos animais marinhos perdem seu senso de direção, uma vez que muitos deles usam concentrações muito pequenas de substâncias naturais (hidrocarbonetos biogênicos) cuja estrutura molecular é semelhante a alguns hidrocarbonetos contidos no petróleo. Estes hidrocarbonetos biogênicos são utilizados como meio de se localizarem em torno de seu ambiente e identificar presas, predadores ou parceiros para a reprodução (RUSHDI *et al.*, 2017). Todas essas interações complexas são comuns em sistemas marinhos e, muitas vezes, não são bem compreendidas até que ocorra uma perturbação maior.

1.2.1 Impactos na saúde humana em decorrência aos derramamentos de petróleo

Após o derrame de petróleo ocorrido em 2010 no Golfo do México com a Deepwater Horizon (2010), vários estudos avaliaram os impactos sobre a saúde mental das pessoas que vivem ao longo da costa do Golfo. Foram documentados impactos à saúde mental de curto prazo, mas os impactos de longo prazo têm sido mais difíceis de identificar, sugerindo que

estudos devem continuar para uma melhor avaliação (SHULTZ & NERIA, 2013; ROSENBERG & LIGENZA, 2015).

Os impactos na saúde humana em decorrência dos derramamentos de petróleo se estenderam além das águas, plantas, animais e habitats. Isso também afetou a saúde das comunidades costeiras ao longo do local do acidente. Os impactos variaram com base no tipo de trabalho que as pessoas realizavam e como estavam ligados ao local onde viviam, pois ocasionou perda de renda e oportunidades de negócios durante o acidente. (GRIFFITHS, 2012; FAN *et al.*, 2015; GOULD, 2015; HANSEL *et al.*, 2015).

O derramamento de petróleo impactou as indústrias pesqueira e de frutos do mar, turismo, petróleo e gás. Os residentes que dependiam dessas indústrias para obter sua fonte de renda ou perderam renda por causa do derramamento de petróleo eram mais propensos a se sentirem ansiosos ou deprimidos, beber mais ou ter mais pensamentos de suicídio do que outros residentes. As pessoas com ligações com a pesca eram mais propensas a ter níveis mais altos de estresse do que outras que também dependiam do Golfo para obter uma fonte de renda (MORRIS *et al.*, 2013; FAN *et al.*, 2015; MAYER *et al.*, 2015; OSOFSKY *et al.*, 2015).

1.3 Composição química do petróleo

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros constituintes que pode ser na forma de gás natural ou líquido dependendo da composição, condição de pressão e temperatura. Para os propósitos deste documento, o termo *petróleo* será usado genericamente para se referir a fase líquida. A composição do petróleo varia dependendo de sua origem. Por essa razão, é difícil fornecer uma composição detalhada do petróleo (ZHU

et al., 2001; BATA *et al.*, 2018; AL-HAWASH *et al.*, 2018). Portanto, a composição molecular exata varia amplamente de formação para formação, mas as proporções dos elementos químicos variam em limites bastante estreitos. O petróleo é essencialmente constituído de hidrocarbonetos ou hidrocarbonetos substituídos nos quais os principais elementos são carbono (85 a 90 %) e hidrogênio (10 a 14 %), e o restante com elementos não-hidrocarbonetos como o enxofre (0,2 a 3 %), nitrogênio (< 0,1 a 2 %), oxigênio (1 a 1,5 %) e compostos organo-metálicos como o níquel, vanádio, arsênico, chumbo e outros metais em concentrações traços (partes por milhão ou partes por bilhão) (ZHU *et al.*, 2001). O termo hidrocarbonetos de petróleo será utilizado para se referir as classes mais representativas dos hidrocarbonetos que compõem o petróleo, sendo elas: hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e heterocíclicos (Figura 1).

Os hidrocarbonetos saturados incluem alcanos não ramificados e ramificados com estruturas alifáticos e alcanos cíclicos, por exemplo, o heptadecano e o ciclopentano, e os isoprenóides, como o pristano e o fitano, que variam em comprimento de cadeia de um carbono a mais de 40 carbonos. Os saturados geralmente são os constituintes mais abundantes nos petróleos (MAHJOUBI *et al.*, 2018). Os hidrocarbonetos aromáticos incluem os aromáticos monocíclicos (por exemplo, benzeno e o tolueno) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs, *Polycyclic aromatic hydrocarbons*), por exemplo, o naftaleno, pireno, fenantreno, criseno e o benzo(a)pireno, que possuem dois ou mais anéis aromáticos fundidos. Devido à sua alta estabilidade química e baixa solubilidade aquosa, eles persistem por longos períodos em locais contaminados, especialmente os PAHs de alta massa molecular que são compostos de 4 a 6 anéis (ALY SALEM *et al.*, 2014).

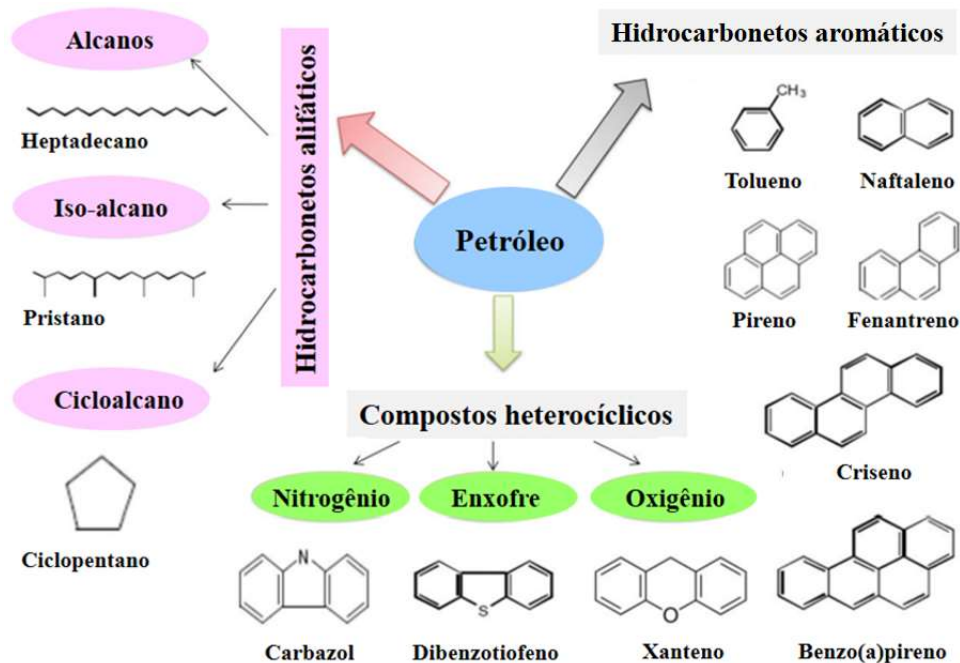


Figura 1. Composição e diferentes classes mais representativas dos hidrocarbonetos que compõem o petróleo. Exemplos de alifáticos (heptadecano, pristano e pentano), aromáticos (tolueno, naftaleno, pireno, fenantreno e criseno) e compostos heterocíclicos (carbazol, dibenzotiofeno, xanteno e benzo(a)pireno). Adaptado de: MAHJOUBI *et al.*, 2018.

Os PAHs são considerados carcinogênicos possíveis ou prováveis e, portanto, suas presenças no meio ambiente e possível exposição a humanos têm sido motivo de preocupação (ALMEDA *et al.*, 2013; QUADROS *et al.*, 2016). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) identificou 16 PAHs como poluentes prioritários (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, bibenzo(ah)antraceno e benzo(g,h,i)perileno) (DÖRR DE QUADROS *et al.*, 2016; BELO *et al.*, 2017). Os hidrocarbonetos heterocíclicos incluem compostos polares contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio, como, por exemplo, carbazol e dibenzotiofeno e xanteno (MAHJOUBI *et al.*, 2018).

1.4 Destino do petróleo após o derramamento no ambiente marinho

Assim que o petróleo é derramado no ambiente marinho, está sujeito a vários processos físicos, químicos e biológicos, como a evaporação, espalhamento, dissolução, dispersão, emulsificação, sedimentação, foto-oxidação e biodegradação, denominados de “*intemperismo*”. Os processos de intemperismo são altamente dependentes de fatores ambientais, como temperatura, correntes oceânicas e condições climáticas (AFENYO *et al.*, 2016).

Durante as primeiras horas após um derramamento do petróleo ocorre o *espalhamento* do petróleo na superfície da água do mar e diminui a espessura da camada do petróleo. Subsequentemente, ocorre a *evaporação* de hidrocarbonetos voláteis e *dispersão* vertical do petróleo em pequenas gotículas na coluna de água, seguido da *dissolução* de hidrocarbonetos solúveis em água. A *sedimentação* do petróleo disperso é grandemente influenciada pela quantidade de sólidos suspensos (sedimentos finos e outras partículas) presentes na coluna de água. Estas gotículas do petróleo dispersas podem se ligar a sólidos suspensos e alterar suas características físicas, incorporando-os em áreas de solo aquático. A *emulsão* refere-se à formação de micelas que encerram gotículas de água dentro de uma película hidrofóbica. A *foto-oxidação* por luz UV causa a oxidação de hidrocarbonetos principalmente aromáticos. Esse processo altera as características do petróleo, o que pode afetar o processo subsequente de biodegradação do petróleo (AFENYO *et al.*, 2016).

A biodegradação é considerada o principal mecanismo natural de intemperismo para a remoção de hidrocarbonetos de petróleo do ambiente marinho (AFENYO *et al.*, 2016; SHAO *et al.*, 2017), desde que algumas condições como biodisponibilidade do

contaminante, presença de enzimas microbianas e condições ambientais (por exemplo, oxigênio, pH e nutrientes) sejam favoráveis ao processo.

1.4.1 Remediação de ambientes marinhos devido a derramamentos de petróleo

Os derramamentos de petróleo geralmente geram uma grande preocupação devido seus efeitos deletérios potenciais no meio ambiente. O ambiente pode ser afetado pelo petróleo derramado em vários espaços do ambiente: ar, área costeira, superfície do mar, coluna de água e sedimentos (AFENYO *et al.*, 2016; SHAO *et al.*, 2017). Os que respondem a um vazamento de petróleo devem considerar uma ampla variedade de fatores, como os planos de resposta, a localização do derramamento, as condições climáticas, o tipo de derramamento de petróleo, a disponibilidade de mão de obra, equipamento e outras variáveis. Cada derramamento de petróleo necessita ser tratado de maneira específica em função das suas particularidades (WAN & CHEN, 2018). Para mitigar os impactos ambientais, se torna essencial a consideração dos benefícios e limitações da resposta a derramamentos de petróleo e a utilização de métodos apropriados à situação. As três técnicas primárias de resposta no mar para responder a um derramamento de petróleo são: (i) contenção mecânica de petróleo derramado com barreiras flutuantes e coleta usando dispositivos de recuperação. O petróleo recuperado é armazenado para processamento ou descarte subsequente, (ii) queima controlada (*in-situ*): o petróleo é encurralado em barreiras resistentes ao fogo e incendiado. A queima converte o petróleo flutuante em produtos de combustão (principalmente como dióxido de carbono e vapor de água com pequenas quantidades de fuligem e outros gases) e (iii) uso de dispersantes sintéticos transfere o

petróleo flutuante para a coluna de água como pequenas gotículas. O petróleo disperso é rapidamente diluído.

O princípio de resposta é o mesmo para cada uma destas técnicas, evitar ou limitar o contato do petróleo derramado com áreas costeiras do ambiente marinho e assim proteger os recursos ecológicos e socioeconômicos que podem ser afetados. Outro princípio é proteger a saúde humana, minimizando a exposição de equipes de resposta e comunidades locais ao petróleo.

1.5 Biorremediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo

Em comparação com o tratamento químico (queima *in situ* do petróleo), severo e físico (contenção e remoção) na tentativa de remediar ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, a biorremediação tem o potencial de eliminar poluentes através da mineralização bioquímica de forma permanente e econômica (AFENYO *et al.*, 2016; WAN & CHEN, 2018). Além disso, a biorremediação possui vantagens em relação à remediação química e física, por exemplo, baixo custo, poucos ou nenhum subproduto, reutilização, ambientalmente correta e é amplamente aplicada na biorremediação de ambientes marinhos impactados por derramamento de petróleo (SHAO *et al.*, 2017).

A biorremediação consiste na utilização das atividades biológicas por microrganismos para a mitigação ou completa eliminação dos efeitos nocivos causados pelos poluentes ambientais em um dado local (DELLAGNEZZE *et al.*, 2014; MEYER *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017). A pesquisa sobre a utilização de microrganismo como uma forma biológica de biorremediar ambientes contaminados por derramamentos de petróleo,

influenciou a comunidade científica após a publicação do trabalho de BUSENELL & HAAS (1941) e de uma revisão inovadora de ZoBell (1946) que abordavam a aplicação de microrganismos que biodegradavam hidrocarbonetos. Desde então, esforços consideráveis têm sido investidos para entender quais fatores contribuem para alcançar os melhores resultados na descontaminação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. A biorremediação é uma área multidisciplinar de conhecimento e expertise que envolve ciência básica e aplicada. Microbiologistas, biólogos moleculares, biotecnólogos, químicos, engenheiros ambientais e ecologistas, por exemplo, fizeram grandes contribuições ao longo do tempo (CANTWELL *et al.*, 1978; SCHAEFFER *et al.*, 1979; KIYOHARA *et al.*, 1982; COOPER & GOLDENBERG, 1987; ATLAS, 1991; SIEGMUND & WAGNER, 1991; WATT, 1994; BRADDOCK & CATTERALL, 1999; BODOUR & MAIER, 2002; VERMA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007; ARULAZHAGAN *et al.*, 2010; ARULAZHAGAN & VASUDEVAN, 2011; MCFARLIN *et al.*, 2014; MAIER & GENTRY, 2015; ABBASIAN *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2017; KOOLIVAND *et al.*, 2017; PUGAZHENDI *et al.*, 2017; MAHJOUBI *et al.*, 2018).

Embora a biorremediação não seja uma técnica de resposta rápida a derramamentos de petróleo em ambientes marinhos para limitar a disseminação do petróleo e recuperá-lo, as atividades subsequentes de limpeza de longo prazo podem incluir a técnica de biorremediação. Diversos trabalhos têm sido publicados com o objetivo de prospectar, isolar e caracterizar microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) com atividades biorremediadoras, como: *Achromobacter* sp., *Actinobacteria* sp., *Arthrobacter aureescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cibi*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Coprothermobacter* sp., *Desulfitobacter* sp., *Desulfosporosinus* sp., *Gammaproteobacteria* sp., *Methanobacterium* sp., *Methanosaeta* sp., *Mycobacterium givum*, *Novosphingobium*

pentaromativorans, *Ochrobactrum* sp., *Pantoea agglomerans*, *Planomicrobium alkanoclasticum*, *Pseudomona* sp., *Pseudomona aeruginosa*, *Rhodobacter* sp., *Rhodococcus erythropolis* e *Stenotrophomonas acidaminiphila* (LIU *et al.*, 2009; ATLAS & HAZEN, 2011; ARULAZHAGAN & VASUDEVAN, 2011; CERQUEIRA *et al.*, 2011; DENG *et al.*, 2014; SHEPPARD *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2017; ROY *et al.*, 2018).

Tecnologias de biorremediação têm sido cada vez mais propostas pela comunidade científica, através das estratégias de bioatenuação (atenuação natural e/ou biorremediação intrínseca), bioaugmentação e bioestimulação de microrganismos para mitigar os impactos ambientais em sítios contaminados (BENTO *et al.*, 2005; SHEPPARD *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017; ROY *et al.*, 2018). A biodegradação ocorre predominantemente sob condições aeróbicas, e é essencial para a técnica de biorremediação. Portanto, apenas nesta condição a biodegradação será tratada neste documento.

A *bioatenuação* é uma estratégia de tratamento *in situ* que utiliza processos abióticos e bióticos onde a microbiota nativa do próprio local é utilizada para realizar a biorremediação pela biodegradação e reduzir a concentração e quantidade de poluentes (BENTO *et al.*, 2005; MOHAMED *et al.*, 2006). A *bioaugmentação* envolve a adição de comunidades microbianas exógenas (estrangeiros e/ou geneticamente modificados) para aumentar a taxa de biodegradação (NASSERI *et al.*, 2010). As linhagens exógenas geralmente têm a desvantagem de serem rapidamente superadas pelos microrganismos autóctones (nativos), devido a dependerem de uma adaptação bem-sucedida antes que o desenvolvimento bacteriano possa ocorrer. Alguns estudos demonstraram que microrganismos nativos localmente adaptados tendem a biodegradar substratos mais efetivamente do que linhagens exógenas em compartimentos contaminados (BENTO *et al.*, 2005; COLLA *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2017).

A *bioestimulação* é uma estratégia usada para estimular as bactérias nativas naturalmente presentes no local contaminado, ajustando as condições ambientais (relações de carbono:nitrogênio:fósforo; C:N:P) por meio de ações como a adição de nutrientes (BENTO *et al.*, 2005; SHEPPARD *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2017). As taxas de biodegradação estão diretamente relacionadas aos macronutrientes, tais como, por exemplo, nitrogênio e fósforo do local onde ocorreu a derrama. A biodisponibilidade destes nutrientes é fator limitante no processo de biodegradação. A indisponibilidade de N e P influenciará negativamente na fisiologia básica da microbiota, como na formação de ácidos nucleicos, moléculas energéticas (adenosina trifosfato; ATP) e proteínas, estes constituintes celulares básicos (PALIWAL *et al.*, 2012; ROY *et al.*, 2018). Um exemplo de aplicação da estratégia de bioestimulação foi o ocorrido após o derramamento de petróleo do navio Exxon Valdez (1989). Na tentativa de superar os baixos níveis de N e P nas praias de Prince William Sound no Golfo do Alasca, grandes quantidades de fertilizantes (aproximadamente 50.000 kg de N e 5000 kg de P) foram adicionados durante os verões de 1989 a 1992 (BOUFADEL *et al.*, 2010). Entretanto, a adição descontrolada de nutrientes, poderá se tornar um risco ecológico, porque todos os organismos capazes de utilizar os nutrientes se beneficiarão e aumentará o risco de eutrofização, além de interferir na microbiota biodegradadora dos contaminantes (ATLAS & HAZEN, 2011).

1.5.1 Potencial genético e vias metabólicas de biodegradação aeróbica dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs

Devido à alta diversidade de estruturas químicas dos compostos que compõem o petróleo se impõem à comunidade microbiana a necessidade da exposição prévia (adaptação

ou aclimatação) ao contaminante, que criará um ambiente em que uma via metabólica para a biodegradação será mantida dentro da comunidade adaptada (ATLAS & HAZEN, 2011). A adaptação de populações microbianas ocorre mais comumente pela indução de enzimas necessárias para a biodegradação destes compostos, seguida por um aumento na população microbiana. A biodegradação desses contaminantes requer um segundo tipo de adaptação que envolve uma mudança genética, como a mutação ou transferência genética de parte do genoma e/ou plasmídeo que compõem genes que codificam enzimas para a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. Isso inclui as proteínas necessárias para a absorção dessas moléculas, síntese de biosurfactantes, a enzimas específicas usadas para a transformação dessas moléculas recalcitrantes em dióxido de carbono e água (mineralização), o que resultará no desenvolvimento de novas capacidades metabólicas (ABBASIAN *et al.*, 2016). O tempo necessário para uma adaptação que exija uma mudança genética ou para a seleção e desenvolvimento de uma comunidade biodegradadora ainda não é previsível, mas o processo pode exigir de semanas, meses a anos ou pode não ocorrer (MAIER & GENTRY, 2015). DENG *et al.*, (2014), isolaram e caracterizaram uma bactéria (*Achromobacter* sp. HZ01) de água do mar contaminada com petróleo que foi capaz de biodegradar 96,6 % dos hidrocarbonetos alifáticos após 10 dias de incubação e 28, 51, e 38,4 % de antraceno, fenantreno e pireno, respectivamente, após 30 dias de incubação.

Segundo ABBASIAN *et al.*, (2016), os genes que codificam as alcanos monooxigenases em *Pseudomonas putida* GP01 estão presentes em dois *operons* de genes *Alk* localizados no plasmídeo OCT e fazem parte de um elemento móvel que se integra no plasmídeo OCT. As alcanos monooxigenases são as enzimas mais comuns encontradas em bactérias biodegradadoras de alcanos. Segundo VAN BEILET *et al.* (2001), os agrupamentos *Alk* consistem de um fragmento contendo o *operon AlkBFGHJKL* e

fragmentos contendo o operon *AlkST*. O operon *AlkBFGHJKL* codifica diferentes enzimas necessárias para a oxidação de alcanos a acetil-CoA, nomeadamente; a alcano hidroxilase (*AlkB*), duas rubredoxinas (*AlkF* e *AlkG*), um álcool e aldeído desidrogenase (*AlkJ* e *AlkH*), uma sintetase acil-CoA (*AlkK*) e uma proteína de membrana externa de função desconhecida (*AlkL*), enquanto o operon *AlkST* codificando a redutase da rubredoxina (*AlkT*) e o *AlkS* que regula positivamente a expressão do operon *AlkBFGHJKL* e também os genes *AlkST* (*AlkSp1* e *AlkSp2*). A mesma estrutura de operon existe em *P. putida* P1, mas *AlkST* foi movido para uma posição a montante do operon e também os genes *AlkL* e *AlkN* não estão separados por uma sequência de inserção. O gene *AlkN*, que codifica uma proteína transdutora de metilação que pode estar envolvida na quimiotaxia do alcano (Figura 2) (VAN BEILEN *et al.*, 2001; ABBASIAN *et al.*, 2016).

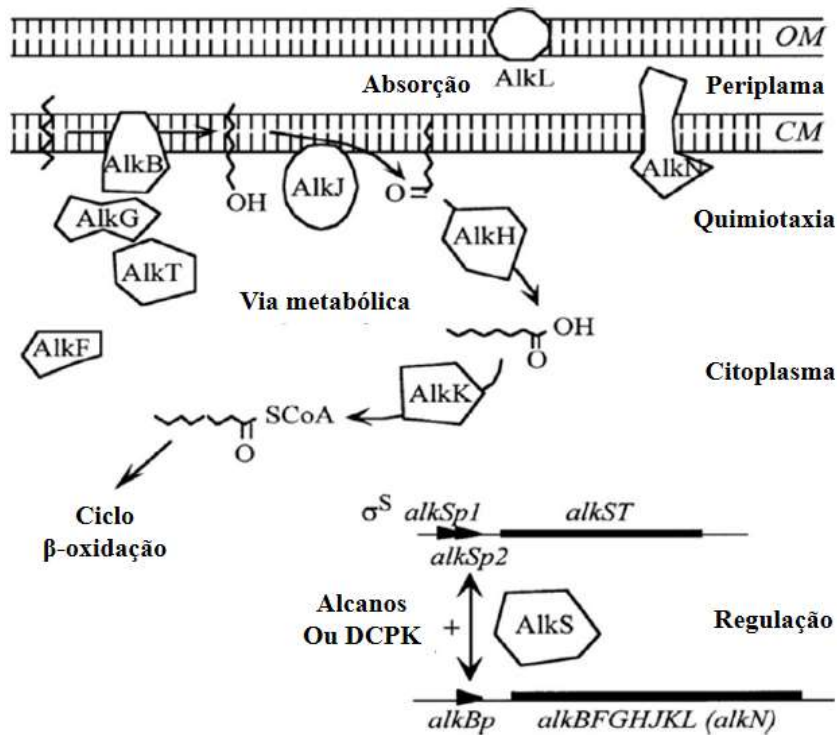


Figura 2. Modelo da via metabólica, localização, função do operon e produtos do gene *Alk* durante a biodegradação dos alcanos. O operon *AlkBFGHJKL* codifica o alcano hidroxilase (*AlkB*), duas rubredoxinas (*AlkF* e *AlkG*), um álcool e uma aldeído desidrogenase (*AlkJ* e *AlkH*, respectivamente), uma sintetase acil-CoA (*AlkK*) e uma proteína da membrana externa de função desconhecida (*AlkL*). O locus *AlkST* codifica o terceiro componente do sistema alcano hidroxilase, redredoxina redutase (*AlkT*) e *AlkS*, que regula positivamente a expressão do operon *AlkBFGHJKL* e o gene *AlkST*. O gene *AlkN* é um putativo transdutor quimiotático para alcanos. Adaptado de: ABBASIAN *et al.*, 2016.

A biodegradação de hidrocarbonetos pode ser dividida em modos de metabolismo aeróbico e anaeróbico. A via aeróbia de biodegradação de alcanos é realizada por incorporação de oxigênio molecular no hidrocarboneto por uma alcano monooxigenase ligada à membrana e duas enzimas solúveis, rubredoxina e rubredoxina redutase, que atuam como transportadores de elétrons entre o NADH e a hidroxilase para conversão do alcano em álcool. Comumente, a oxidação ocorre em um ou ambos os grupos metila terminal ou em uma localização subterminal (Figura 3). O ataque intracelular inicial dos contaminantes

orgânicos é um processo oxidativo, este ataque resulta na adição de oxigênio ao alcano (hidrocarboneto) para formar álcool que é subsequentemente oxidado a aldeído e finalmente em ácido graxo, antes de prosseguir para β -oxidação e ciclo do ácido tricarbóxico (ciclo TCA) para produzir energia. A adição de oxigênio a compostos de hidrocarbonetos os torna mais polares e, portanto, mais solúveis. Assim, as vias de biodegradação periféricas convertem os poluentes orgânicos, passo a passo, em intermediários do metabolismo intermediário central (VAN BEILEN *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2015; MAIER & GENTRY, 2015; ABBASIAN *et al.*, 2016).

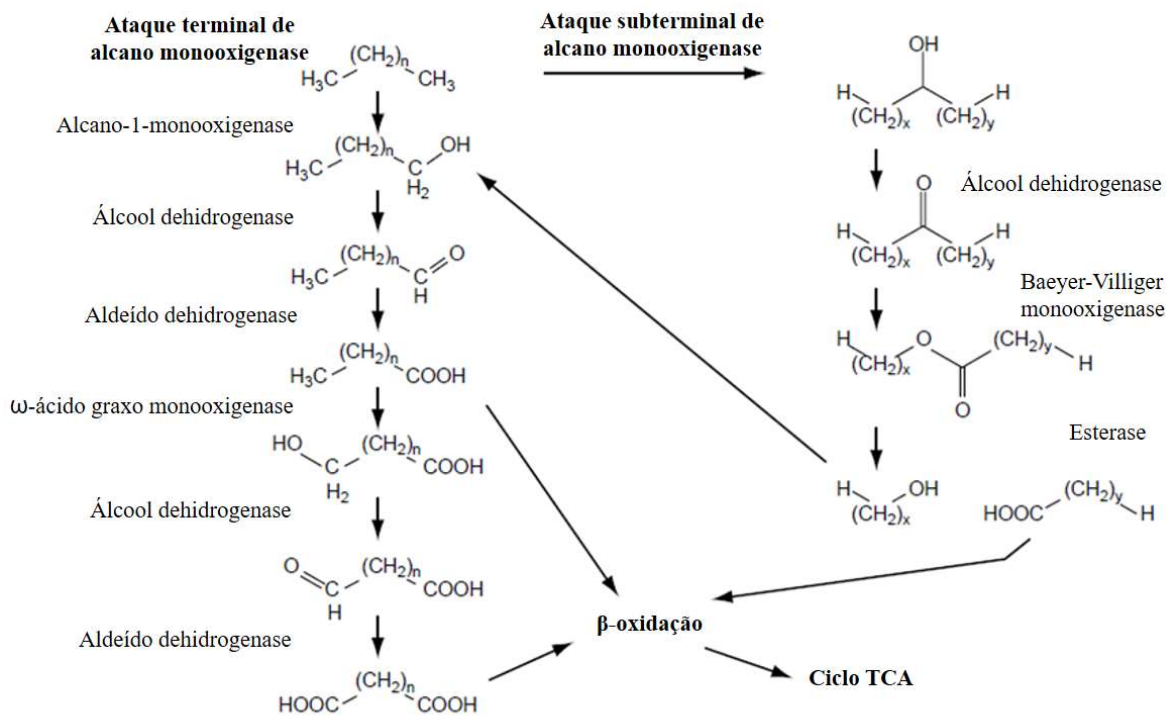


Figura 3. Modelo da via metabólica para a biodegradação de alcanos por oxidação terminal e subterminal. A oxidação terminal leva à formação de ácidos graxos, que entram na via de β -oxidação. Alternativamente, pode ocorrer a ω -hidroxilação por uma mono-oxigenase ou alcano-hidroxilase de ácido graxo, conduzindo a ácidos dicarbóxicos. A oxidação subterminal dá origem a álcoois secundários, que são oxidados a cetonas. Uma monooxigenase de Baeyer-Villiger converte cetonas em ésteres, que são subsequentemente clivados por uma esterase. Adaptado de: VAN BEILEN *et al.*, 2003.

Existe uma ampla diversidade genética entre organismos capazes de biodegradar os PAHs. A *Pseudomonas putida* é uma bactéria que pode ser usada para o processo de biorremediação no meio ambiente (MESQUITA *et al.*, 2013). Segundo SINGLETON *et al.*, (2009) os membros do gênero *Pseudomonas* geralmente contêm os genes do tipo *Nah* que codificam os genes para as enzimas dioxigenase que estão tipicamente associados à biodegradação do naftaleno, fluoranteno, benz[a]antraceno, criseno, pireno e benzo[a]pireno, por exemplo (KANALY & HARAYAMA, 2000; JOUANNEAU *et al.*, 2016; NIE *et al.*, 2017). Na natureza, muitos compostos são transformados em intermediários antes de serem biodegradados. Os compostos aromáticos são oxidados pela incorporação de oxigênio molecular no anel aromático. Isto é possível pelas vias metabólicas das dioxigenases, que introduzem um ou dois átomos de oxigênio, respectivamente, no anel benzeno.

É mais comum que organismos empreguem as dioxigenases para incorporar a molécula de oxigênio no benzeno para formar um *cis*-diol (di-hidrodiol), que são então rapidamente transformados a intermediários de decomposição de compostos de anel aromático como o catecol (em bactérias) ou protocatecoato (na maioria dos fungos e em algumas bactérias). O catecol, intermediário mais comum na biodegradação aeróbia de PAHs pode ser substituído durante a biodegradação de benzenos alquilados (KANALY & HARAYAMA, 2000; DAS & CHANDRAN, 2011), como visto na Figura 4.

Uma vez que o catecol é formado, o anel pode ser clivado em fragmentos que podem ser ainda mais biodegradados. Essa oxidação pode ocorrer por *orto*-fissão (entre os grupos hidroxila) ou *meta*-fissão (adjacente a um dos grupos hidroxila). A *orto*-clivagem do catecol é catalisada pela catecol 1,2-dioxigenase (C12O) e gera ácido *cis,cis*-mucônico que pode entrar na β -oxidação, com acetil-CoA e succinil-CoA como produtos que pode entrar no

ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA). A *meta*-clivagem de catecol é catalisada por catecol 2,3-dioxigenase (C23O) e produz semialdeído 2-hidroxiacético, que é eventualmente clivado em acetaldeído e piruvato. Então, através de uma via metabólica central irá gerar como produtos finais acetil-CoA, succinato ou piruvato, que poderão ser utilizados para o desenvolvimento microbiano. Estas enzimas podem ser cromossômicas ou codificada por um plasmídeo. Os genes C12O e C23O são amplamente distribuídos na natureza (FUCHS *et al.*, 2011; PENG *et al.*, 2015; JOUANNEAU *et al.*, 2016; NIE *et al.*, 2017).

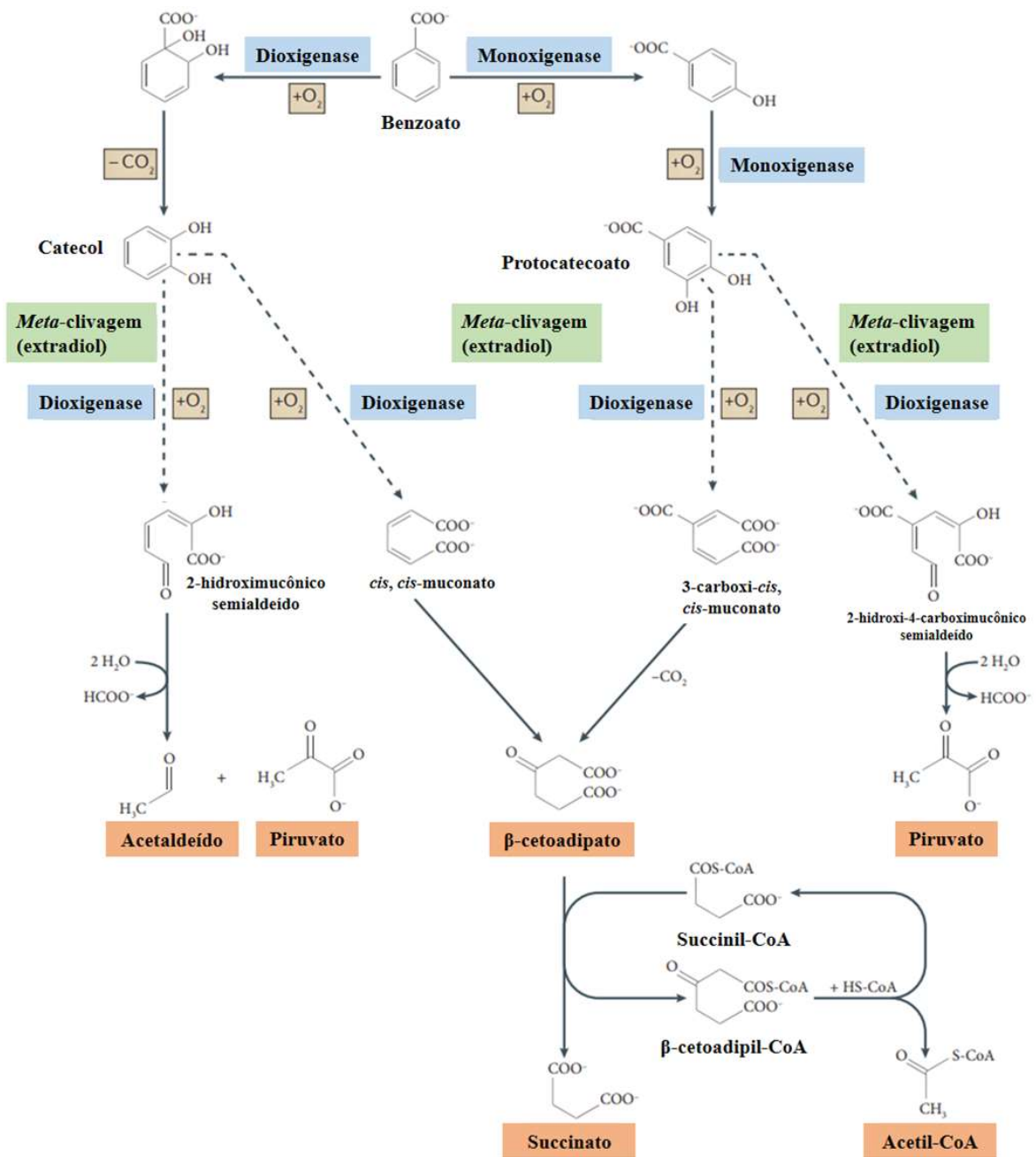


Figura 4. Modelo da via β -cetoadipato e dioxigenases de clivagem em anel benzeno. A biodegradação aeróbica do benzoato por bactérias e fungos como um exemplo de uma estratégia clássica dependente de oxigênio para a clivagem do anel aromático. Os fungos convertem benzoato principalmente em protocatecoato, por mono e dioxigenases, enquanto a maioria das bactérias forma catecol. As dioxigenases de clivagem do anel aromático da via central clivam o anel entre os dois grupos hidroxilo (*orto*-clivagem, observado na via do β -cetoadipato) ou junto a um dos grupos hidroxilo (*meta*-clivagem). Adaptado de: FUCHS *et al.*, 2011.

1.5.1.1 Estrutura química do contaminante

1.5.1.1.1 Efeito estérico

O efeito estérico está relacionado a estereoquímica da molécula do contaminante. A presença de grupos ramificados pode retardar a biodegradação, alterando mesmo que temporariamente o sítio ativo da enzima responsável pela transformação do substrato. Quando o sítio ativo da enzima é bloqueado por ramificações impedindo a reação química, é conhecido como efeito estérico como ilustrado na Figura 5, que compara duas estruturas de hidrocarbonetos alifáticos, o octano (Figura 5 A) e o mesma cadeia principal do octano, com quatro metilas (ramificações), 3,3,6,6-tetrametiloctano (Figura 5 B) (MAIER & GENTRY, 2015). Alguns tipos de compostos presentes no petróleo, como, por exemplo, os isoprenóides (pristano e fitano) de origem antropogênica ou natural, apresentam um caráter de maior recalcitrância, quando comparado aos hidrocarbonetos alifáticos não ramificados (SILVA *et al.*, 2007; PAUDYN *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2011). Compostos que contém ramificações do tipo metilas, influenciam negativamente as taxas de biodegradação, mesmo se a estrutura do contaminante for semelhante às moléculas que ocorrem naturalmente. Geralmente, estas moléculas são mais resistentes à biodegradação quando as ramificações estão localizadas próximas e/ou no final das estruturas das moléculas, uma vez que a oxidação se inicia pela extremidade da molécula (BEREKAA & STEINBÜCHEL, 2000; VAN BEILEN *et al.*, 2003; FUCHS *et al.*, 2011). Grupos ramificados ou funcionais também podem afetar o transporte do substrato através da membrana celular, especialmente se o transporte for assistido por enzima. O efeito estérico geralmente aumenta à medida que o

tamanho do grupo funcional aumenta (OPPERHULZEN *et al.*, 1985; PITTER & CHUDOBA, 1990).

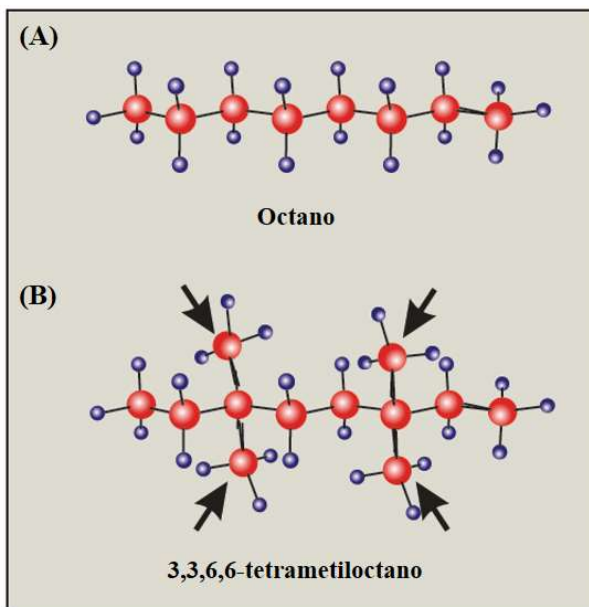


Figura 5. Estrutura química de dois compostos orgânicos. Em (A) está representado a estrutura química do octano, que é facilmente biodegradada, e em (B) a estrutura química do 3,3,6,6-tetrametiloctano com quatro ramificações (metilas) que não é biodegradada facilmente porque os grupos metila bloqueiam o sítio de catálise enzima-substrato. Adaptado de: MAIER & GENTRY, 2015.

1.5.1.1.2 Efeito Eletrônico

Grupos funcionais, presentes nas estruturas químicas das moléculas que compõem os contaminantes, podem contribuir com o efeito eletrônico, por serem doadores ou aceptores de elétrons, interferindo na interação entre o contaminante e o sítio ativo da enzima que catalisa as reações químicas no processo de transformação das moléculas recalcitrantes. Os grupos funcionais, como a metila (doadoras de elétrons) ou os nitrocompostos (NO_2 , aceptores de elétrons), podem alterar a densidade eletrônica do local da reação. Via de regra,

grupos funcionais que aumentam a densidade eletrônica no sítio ativo da enzima aumentam as taxas de biodegradação, como pode ser ilustrado na Figura 6 (MAIER & GENTRY, 2015). PITTER & CHUDоба (1990) avaliaram a relação entre as eletronegatividades de grupos funcionais e a taxa de biodegradação. Compararam a eletronegatividade de uma série de fenóis *orto*-substituídos com as suas respectivas taxas de biodegradação, e se verificou que à medida que a eletronegatividade dos substituintes aumentava, as taxas de biodegradação reduziam (Figura 6).

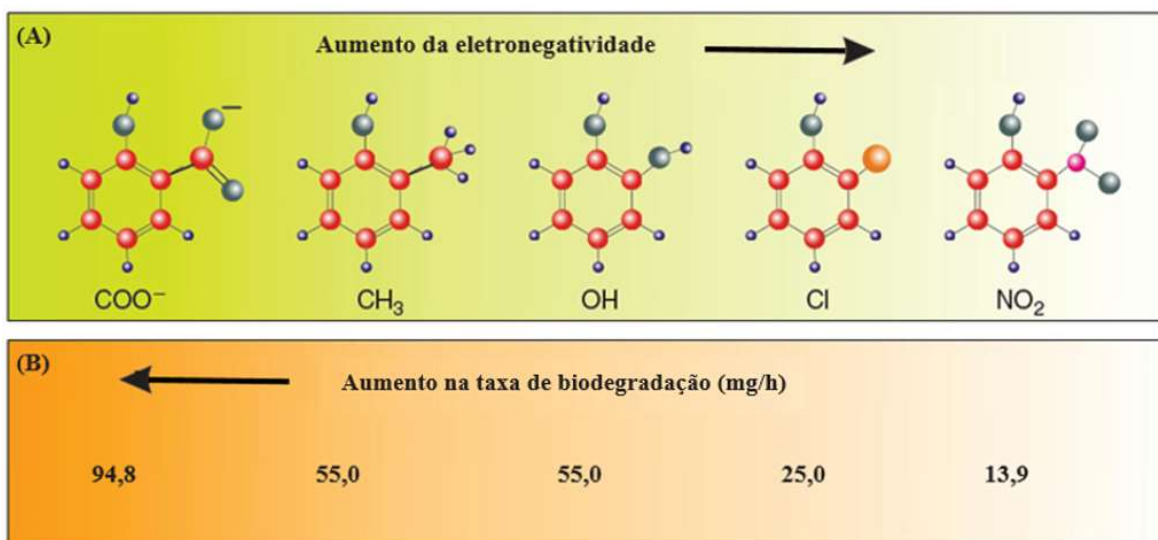


Figura 6. Efeito dos grupos doadores e aceptores de elétrons na estrutura química do contaminante *verso* a taxa de biodegradação. Os fenóis *orto*-substituídos por grupos (acetil, alquil, hidroxil, haleto e nitro) e suas respectivas taxas de biodegradação. Adaptado de: PITTER & CHUDоба, 1990; MAIER & GENTRY, 2015.

1.5.2 Fatores que influenciam na biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo

O entendimento de que a taxa de biodegradação dos constituintes do petróleo no ambiente marinho é influenciada por fatores biológicos e físico-químicos, é fundamental. Em um ambiente contaminado por hidrocarbonetos de petróleo, a densidade dos gêneros

microbianos, potencial genético que codifique enzimas capazes de metabolizar os contaminantes, capacidade de produzir biossurfactantes para biodisponibilizar o substrato no meio aquoso, adaptação ao ambiente para suportar as variações de temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio e nutrientes, assim como a salinidade, são importantes para a compreensão do processo de biodegradação (WU *et al.*, 2017; AL-HAWASH *et al.*, 2018).

1.5.2.1 Produção de biossurfactantes

Os biossurfactantes são tensoativos extracelulares secretados por microrganismos. Espécies microbianas já relatadas por produzir compostos biossurfactantes incluem certos eucariotos unicelulares e vários gêneros de procariotos gram-negativos e gram-positivos, tais como: *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Candida* spp., *Flavobacterium* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp., *Serratia mercencis* e outros (GEETHA *et al.*, 2018). Os biossurfactantes são compostos versáteis que podem ser utilizados para diversas aplicações, incluindo a biorremediação, remoção de petróleo residual em tanques de armazenamento, recuperação avançada de petróleo, como antimicrobianos na área médica e nas indústrias de alimentícia, cosmética e farmacêutica (SHAO *et al.*, 2017; GEETHA *et al.*, 2018; NAYARISSERI *et al.*, 2018; PATOWARY *et al.*, 2018).

Os tensoativos microbianos são um grupo estruturalmente diverso de moléculas de superfície ativa e são classificados em dois grupos: o agente tensoativo de baixa massa molecular é chamado de biossurfactante e o de alta massa molecular designada por bioemulsificantes (UZOIGWE *et al.*, 2015). Existem cinco classes principais que incluem glicolipídios (por exemplo, ramnolipídeos, sopolipídeos), lipopeptídeos (por exemplo,

surfactinas, iturinas, fengicinas), fosfolípidos, compostos poliméricos e lípidos neutros (UZOIGWE *et al.*, 2015). Os biossurfactantes são conhecidos por serem capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre diferentes fases (líquido-líquido, líquido-ar e líquido-sólido), com baixa concentração micelar crítica (CMC) e formação de emulsões estáveis, aumentando a biodisponibilidade de contaminantes para a biodegradação em processos de biorremediação (SATPUTE *et al.*, 2010; SHAO *et al.*, 2017).

Recentemente, MORO *et al.*, (2018) demonstraram a aplicação do extrato bruto contendo surfactinas, extraído do meio de cultura livre de células (*Bacillus* spp.) ao avaliar a capacidade de emulsificação, redução da tensão superficial e CMC. Os resultados do índice de emulsificação foram na faixa de 65,7 a 80,5 %, com valores superiores aos 40 % considerados satisfatórios (UZOIGWE *et al.*, 2015). A tensão superficial reduziu de 70,7 mN/m para valores inferiores a 30 mN/m com CMC de 36 mg/L. Para reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para valores abaixo de 40 mN/m, a faixa de CMC deve ser de 1 a 200 mg/L (ZHANG & MILLER, 1992).

Microrganismos biodegradadores de hidrocarbonetos de petróleo que produzem biossurfactantes, têm a capacidade de biodisponibilizar o substrato para o metabolismo. A biodisponibilidade se refere à quantidade de substrato disponível para a absorção e conversão microbiana. Dessa forma, os microrganismos secretam biossurfactantes que, através da formação de micelas, possibilitam o aumento na solubilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos. Esse processo é conhecido como pseudo-solubilização, pois o substrato não é verdadeiramente dissolvido na fase aquosa. Os biossurfactantes também podem atuar como agentes emulsionantes, aumentando a área de contato, diminuindo a tensão superficial e interfacial, facilitando o processo de biodegradação (DAS & CHANDRAN, 2011; MAIER & GENTRY, 2015; ZOUARI *et al.*, 2018).

Uma representação esquemática (Figura 7) da função fisiológica dos biossurfactantes que influencia na taxa de biodegradação foi demonstrada por SWAATHY *et al.*, (2014). Os biossurfactantes secretados pelo *Bacillus licheniformis* MTCC 5514, isolado de ambiente marinho, biodisponibilizou o antraceno (A) pela formação de micelas. A formação de micela reversa na bi-camada lipídica possibilitou o fluxo do antraceno para o interior da célula, onde a biodegradação pelo sistema enzimático das dioxigenases iniciou com a liberação de produtos transformados, naftaleno/antraceno hidroxilado, que são oxidados a antraquinona. Os produtos transformados no primeiro passo podem então ser secretados do citosol através dos biossurfactantes também presentes no citosol. Este tipo de transporte de moléculas de dentro para fora e *vice-versa* ocorre até a realização da biodegradação completa. Dessa forma, é possível observar que enzimas intra/extracelulares desempenharam o papel significativo na biodegradação.

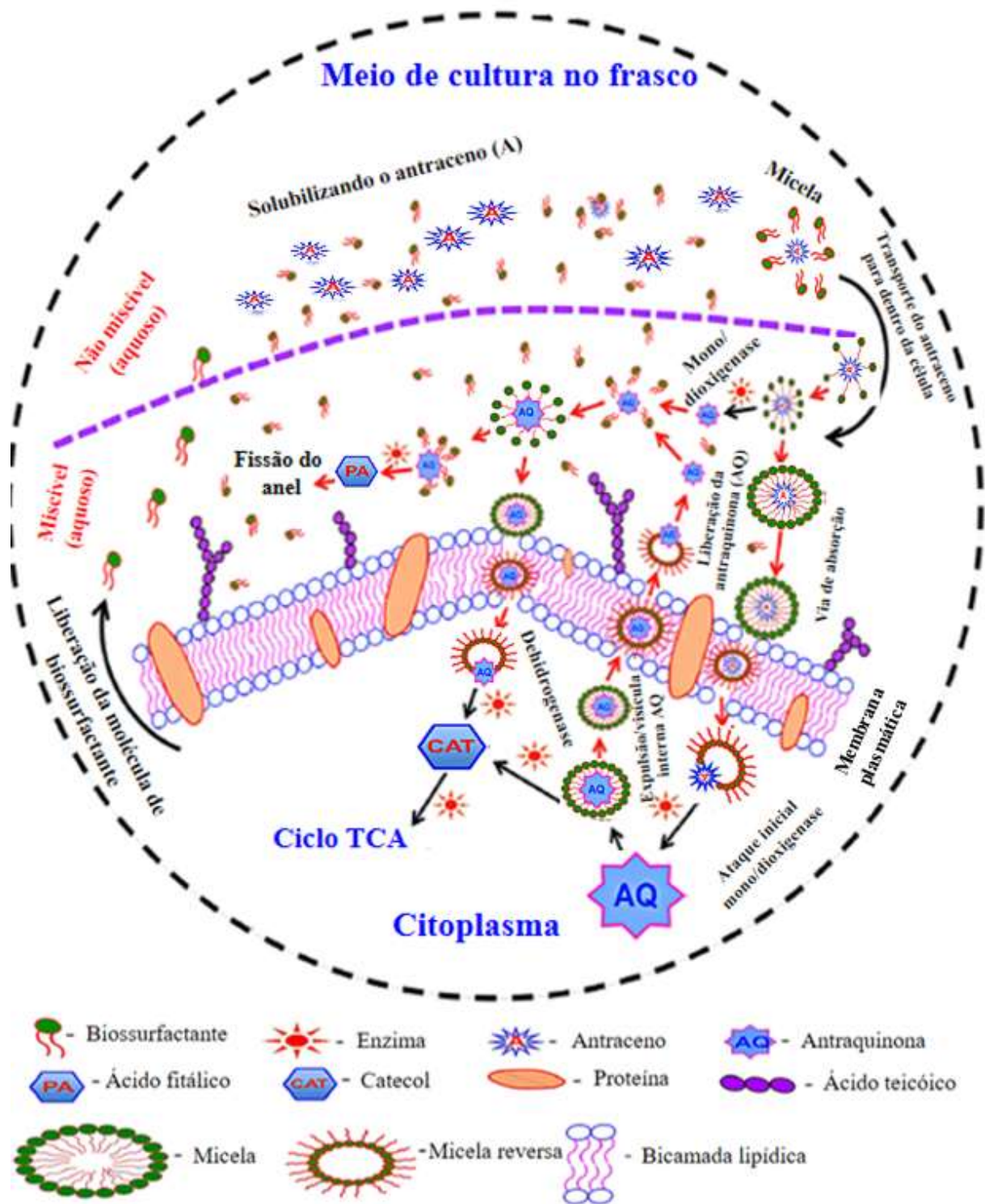


Figura 7. Representação esquemática do mecanismo adotado por *Bacillus licheniformis* MTCC 5514 para biodegradar antraceno na presença de produção *in situ* de biosurfactantes e enzimas mono e dioxigenase. A seta preta representa o sentido da natureza da reação que ocorre durante a biodegradação e a seta vermelha o sentido do fluxo de reação que ocorre dentro e fora da célula e *vice-versa*. Adaptado de: SWAATHY *et al.*, 2014.

Os bioemulsificantes têm maior massa molecular do que os biossurfactantes, pois são misturas complexas de heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas (por exemplo, emulsan, liposan, alasan, lipomanan) (UZOIGWE *et al.*, 2015). Estas moléculas podem eficientemente emulsionar dois líquidos imiscíveis, tais como hidrocarbonetos ou outros substratos hidrofóbicos, mas, em contraste com os biossurfactantes, são menos eficazes na redução da tensão superficial, mas possibilitam o aumento na área de contato (MONTEIRO *et al.*, 2010; UZOIGWE *et al.*, 2015).

A triagem para a detecção de agentes tensoativos biológicos em meios de cultura se baseou frequentemente nos métodos de CTAB/Azul de metileno, índice de emulsificação, colapso da gota, espalhamento do óleo (petróleo), na medição da tensão superficial, interfacial e aderência bacteriana aos hidrocarbonetos (BATH) também conhecida como hidrofobicidade da superfície celular. Quando os microrganismos apresentam baixa hidrofobicidade superficial é uma indicação de que os agentes emulsionantes foram liberados de forma extracelular no meio de produção (COOPER & GOLDENBERG 1987; SIEGMUND & WAGNER, 1991; BODOUR & MAIER, 2002; BENTO *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2010; RAHMAN *et al.*, 2010; ZOUKEI *et al.*, 2010; CERQUEIRA *et al.*, 2011, MORO *et al.*, 2018; NAYARISSERI *et al.*, 2018; ZOUARI *et al.*, 2018).

Diferentes microrganismos têm sido empregados por muitos pesquisadores na produção de biossurfactantes. A maioria desses microrganismos é isolada de locais contaminados, geralmente contendo produtos de hidrocarbonetos de petróleo e/ou resíduos industriais. O interesse em biossurfactantes têm aumentado constantemente nos últimos anos, uma vez que eles apresentam inúmeras vantagens em comparação aos tensoativos sintéticos, incluindo menor toxicidade, biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, capacidade de emulsificação e redução da tensão superficial e interfacial, além

de apresentarem propriedades efetivas em temperaturas extremas, variações de pH e salinidade (MORO *et al.*, 2018).

1.5.2.2 Efeito da temperatura na biodegradação

A temperatura é considerada um fator limitante para a biodegradação pela ação de microrganismos (psicrófilos e mesófilos) que têm a capacidade de metabolizar hidrocarbonetos de petróleo, oriundos de derramamentos em regiões desde a Antártica e Ártico até os mares dos trópicos, em temperaturas de aproximadamente -2 até 35 °C (NASA, 2018; McFARLIN *et al.*, 2018; VERGEYNST *et al.*, 2018). Cada microrganismo tem uma faixa de temperatura para o seu desenvolvimento. Entretanto, é na temperatura ótima de desenvolvimento celular que as reações químicas e enzimáticas (atividades metabólicas) passam a ocorrer com maior velocidade e o desenvolvimento é acelerado. A adaptação microbiana à temperatura ambiente não é o resultado de apenas alguns ajustes enzimáticos, mas o resultado de um efeito combinado de ajustes fisiológicos e genéticos complexos (MARGESIN, 2008; AL-HAWASH *et al.*, 2018; VERGEYNST *et al.*, 2018).

DENG *et al.*, (2014) isolou a bactéria *Achromobacter* sp. da água do mar contaminada com petróleo, que demonstrou capacidade de biodegradar hidrocarbonetos alifáticos (C12 a C27) na faixa de 96,6 %, nas condições de pH 7,5, NaCl 3 % (m/v), temperatura de 28 °C a 150 rpm e os PAHs (antraceno, fenantreno e pireno, 29,8, 50,6 e 38,4 %, respectivamente) após 30 dias de incubação.

A necessidade de entender a biodegradação do petróleo em ambientes marinhos árticos está aumentando junto com o crescimento na exploração e transporte de petróleo na região. Recentemente, McFARLIN *et al.*, (2018) relataram a biodegradação do petróleo pela

microbiota nativa (*Ochrobactrum*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Methylophaga*, *Sulfitobacter*, *Glaciacola*, *Colwellia*, *Loktanella*, entre outros), presente na água do mar superficial do Ártico (800 mL) com petróleo e Corexit 9500 (dispersante sintético) a 15 mg/L cada, sob agitação moderada. A biodegradação alcançada foi de 36 a 58 % do petróleo em 63 dias de incubação a -1 °C e de 16 a 36 % a 2 °C.

Em temperatura < 10 °C os hidrocarbonetos da fração pesada terão resistência à quebra extensiva de gotículas maiores que 1 mm, em gotículas de petróleo menores. No ambiente natural e frio a temperatura interfere na taxa e a extensão da biodegradação que serão fortemente influenciadas negativamente pela falta de biodisponibilidade do contaminante que é inversamente proporcional à viscosidade do petróleo que aumenta nestas temperaturas (DAS & CHANDRAN, 2011; ZHAO *et al.*, 2014; McFARLIN *et al.*, 2014 e 2018).

1.5.2.3 Efeito do pH na biodegradação

Assim como a temperatura, o pH também desempenha um papel importante na determinação da capacidade da microbiota de se desenvolver e biodegradar os contaminantes no ambiente. As atividades metabólicas (por exemplo, permeabilidade da através da bicamada lipídica no transporte de nutrientes e o próprio contaminante, reações catalíticas, bem como atividades enzimáticas) dos microrganismos em um sistema estão diretamente relacionadas ao pH (AL-HAWASH *et al.*, 2018). A microbiota, particularmente as heterotróficas (aquelas que usam material orgânico, incluindo hidrocarbonetos), se desenvolvem bem dentro de um intervalo estreito de pH (~ 6,5 a 7,5). Os ácidos orgânicos produzidos como resultado das atividades microbianas reduzem o pH do sistema, tornando-

o mais ácido. Entretanto, a água do mar exerce uma capacidade tamponante, devido à presença de concentrações naturais dos íons bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}) (TEIR *et al.*, 2007; EGGLESTON *et al.*, 2010; JURY *et al.*, 2013; CAI *et al.*, 2017).

1.5.2.4 Efeito do oxigênio na biodegradação

Para a biodegradação dos hidrocarbonetos que constituem o petróleo pelo metabolismo aeróbico, a presença de oxigênio é imprescindível. A oxidação destas moléculas necessita do oxigênio molecular para a atividade das oxigenases. O oxigênio tem solubilidade finita na água do mar ($\sim 7,5$ mg/L a 30°C , aumentando para ~ 15 mg/L a 0°C para água em equilíbrio com o ar ao nível do mar) (VAN BEILEN *et al.*, 2003; FUCHS *et al.*, 2011; SWAATHY *et al.*, 2014; MAIER & GENTRY, 2015; ABBASIAN *et al.*, 2016).

1.5.2.5 Efeito de nutrientes e razão estequiométrica de C:N:P na biodegradação

Um derrame de petróleo em ambiente marinho representa um excesso de carbono que deverá ser mineralizado, produzindo CO_2 e água. Os nutrientes nitrogênio e fósforo são elementos essenciais e têm sido frequentemente relatados como limitantes, no desenvolvimento de biomassa bacteriana para a biodegradação efetiva de hidrocarbonetos de petróleo (BENTO *et al.*, 2005; ATLAS & HAZEN 2011; ROY *et al.*, 2018). A relação de C:N:P conhecida como Relação de Redfield sugere que estes nutrientes estejam na relação em uma proporção de 100:10:1, respectivamente, para o processo de biodegradação (PALIWAL *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2017; VERGEYNST *et al.*, 2018). Embora o petróleo seja rico em energia, carbono e hidrogênio necessários para o desenvolvimento microbiano,

ele é pobre em nutrientes essenciais, como N e P. Para equilibrar a “dieta” da microbiota biodegradadora de petróleo, esses nutrientes podem ser adicionados. A maior aplicação de nutrientes na área costeira para ajudar na biodegradação de um grande derramamento de petróleo foi em Prince William Sound, durante o incidente de 1989 da *Exxon Valdez* (ATLAS & HAZEN 2011). A adição de nutrientes é particularmente importante para o petróleo enterrado, e que a microbiota não tem mais acesso a N e P. A única maneira de restaurar o equilíbrio C:N:P é através da adição de fertilizantes e acelerar a biodegradação. Esse processo, chamado de "bioestimulação", é discutido em maiores detalhes no item 1.5. Neste episódio em particular, após os testes de campo, 48.534 kg de N foram distribuídos em 2.237 aplicações da linha costeira afetada entre 1989 e 1991 (ATLAS & HAZEN 2011). Posteriormente, cerca de 25 a 30 % do total de hidrocarbonetos foram biodegradados na primeira semana; nesse meio tempo, a população de bactérias biodegradadoras cresceu dramaticamente de 10 % da população total de bactérias heterotróficas para 40 %, e retornou aos níveis basais em cerca de um ano e meio (SHORT *et al.*, 2007; BOUFADEL *et al.*, 2010).

1.5.2.6 Efeito da salinidade na biodegradação

Os microrganismos de ambiente marinho são tipicamente bem adaptados para lidar com a ampla gama de salinidades comuns aos oceanos, em média de 3,5 % (BADEJO *et al.*, 2013; SHEPPARD *et al.*, 2014; PAWLOWICZ *et al.*, 2015). A salinidade pode ter grande impacto no desenvolvimento celular e na taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo. BADEJO *et al.*, (2013) estudou o efeito do NaCl na biodegradação do pireno ao submeter uma cultura pura exógena (*Mycobacterium gilvum* PYR-GCK). Esta linhagem

apresentou biodegradação reduzida em até 5,8 % de NaCl, acompanhada de alterações na expressão de alguns genes da dioxigenase que clivam o anel aromático. DENG *et al.*, (2014) ao realizar estudo com um isolado (*Achromobacter* sp. HZ01) de ambiente marinho contaminado com petróleo constatou que este isolado foi capaz de biodegradar 80 % de óleo diesel (mistura de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos), sob a salinidade de até 5 % de NaCl. Outro exemplo é o relatado por CHEN *et al.*, (2017), que isolou a bactéria *Dietzia* sp. CN-3 de sedimentos marinhos contaminados com petróleo. Foi caracterizada como halotolerante, pois teve desenvolvimento em ambiente com 8,5 % de NaCl, ao biodegradar alcanos alifáticos (C11 a C36), na faixa de 52,4 a 88,1 %, pristano (45,4 %) e os aromáticos policíclicos como o fenantreno e pireno, 15 % em média. Portanto, ao realizar prospecção de microrganismos para fins de biorremediação em ambiente marinho, estes devem ser oriundos de compartimentos com histórico de salinidade, por apresentarem tolerância ao sal e, assim, superarem o choque osmótico, quando submetidos à biodegradação, como reportado por LIU *et al.*, (2013); SHEPPARD *et al.*, (2014); ALMEIDA *et al.*, (2017); PUGAZHENDI *et al.*, (2017).

1.6 Estrutura da tese

O presente trabalho está distribuído em três capítulos. O primeiro capítulo (item 2) aborda a prospecção, seleção e identificação de bactérias com capacidade de biodegradar hidrocarbonetos de petróleo em água do mar para a aplicação em biorremediação de ambientes marinhos.

O segundo capítulo (item 3) aborda o trabalho que foi desenvolvido para o exame de qualificação de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM). O objetivo foi sintetizar padrões internos, desenvolver e validar uma metodologia analítica por GC-FID para determinar a pureza de ésteres metílicos de óleo vegetal e gordura animal (biodiesel). Este biocombustível de fonte renovável será submetido ao processo de biorremediação em água do mar em trabalhos futuros, para testar a eficiência de biodegradação dos microrganismos *Bacillus methylotrophicus*, *Pseudomonas sihuiensis* e *Ancylobacter polymorphus*, sob a forma de consórcio microbiano.

Os resultados apresentados no terceiro capítulo (item 4), referem-se ao desenvolvimento e validação de metodologia analítica por GC-FID, para determinar o teor de ésteres metílicos em biodiesel produzido a partir de gordura animal.

2. Capítulo I: Biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos em água do mar por microrganismos autóctones.

O delineamento experimental cujos resultados estão apresentados neste capítulo contou com a colaboração da então aluna de doutorado Amanda Pasinato Napp, atualmente pós-doutora do grupo e da Professora Fátima Menezes Bento do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia desta Universidade. Outros alunos de doutorado participaram no decorrer das atividades: William Lopes (imagens e vídeos do desenvolvimento bacteriano durante a biodegradação dos contaminantes); Júlia Reuwsaat e os Professores Charley C. Staats e Livia Kmetzsch auxiliaram durante a etapa de identificação molecular dos microrganismos, sob a supervisão da Professora Marilene Henning Vainstein.

No Departamento de Química Inorgânica da UFRGS foram realizadas as etapas de extração, fracionamento e concentração dos hidrocarbonetos dos experimentos de biodegradação, com o auxílio da aluna de doutorado Amanda Pasinato Napp e identificação molecular dos biossurfactantes, sob a supervisão da Professora Maria do Carmo Ruaro Peralba e do Dr. Alessandro Dallegrave, respectivamente.

As análises por cromatografia gasosa da biodegradação dos hidrocarbonetos foram realizadas no Departamento de Genética da UFRGS com o auxílio da aluna de doutorado Amanda Pasinato Napp, sob a supervisão da Professora Luciane Maria Pereira Passaglia.

Além disso, as medidas de tensão superficial foram realizadas no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS, sob a supervisão da Professora Fátima Menezes Bento.

2.1 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi prospectar, isolar, identificar e caracterizar microrganismos autóctones com potencial para a biorremediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.

2.1.1 Objetivos específicos

- Bioprospectar, isolar e caracterizar microrganismos de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo;
- Identificar e caracterizar os biossurfactantes produzidos durante os testes de biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos policíclicos com os microrganismos selecionados;
- Avaliar a eficiência de biodegradação dos microrganismos selecionados ao término dos testes de biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos policíclicos.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Amostras de água do mar e petróleo

A água do mar superficial foi coletada (10 L) na plataforma de pesca da cidade de Salinas, estado do Rio Grande do Sul (30° 14' 98.3" S, 50° 18' 75.3" W) e, imediatamente, transportada para o laboratório e armazenada a 4 °C. Para todos os experimentos a água do mar foi filtrada em papel filtro de 125 mm (Whatman®), para a remoção de material particulado em excesso. A análise química dos diferentes componentes na água do mar amostrada foi realizada pela empresa Toxilab. A salinidade foi definida como gramas de sólidos dissolvidos por kg de água do mar. Tradicionalmente, a unidade de frações de massa (g/kg) foi expressa como porcentagem, ou como ppt (parte por mil, do inglês - *meaning part per thousand*) (PAWLOWICZ *et al.*, 2015). O volume de 5 L de petróleo (Bazu) foi obtido da TRANSPETRO S.A., subsidiária da BR PETROBRAS.

2.2.2 Bioprospecção das amostras para o isolamento dos microrganismos

Para a realização dos estudos de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, as amostras de solo e água foram coletadas (profundidade de 1 a 6 cm) em triplicatas para tubos do tipo *Falcon* estéreis (50 mL) e armazenadas sob refrigeração a 4 °C, segundo a metodologia descrita por JAYANTHI & HEMASHENPAGAM (2015). A coleta das amostras realizadas no Parque Nacional da Lagoa do Peixe (PNLP), localizado na cidade de Mostardas, estado do Rio Grande do Sul foi autorizada (Nº 53950-1) pelo Ministério do Meio Ambiente. Os pontos (A, B e C) de bioprospecção das amostragens estão definidos

pelas coordenadas geográficas: 31° 21' 12" S, 51° 02' 55" W (sedimento - S), 31° 21' 31" S, 51° 02' 37" W (sedimento com água do mar - SAM) e 31° 21' 38" S, 51° 02' 21" W (água do mar - AM), respectivamente, como demonstradas na Figura 8.



Figura 8. Localização dos pontos de bioprospecção no Parque Nacional da Lagoa do Peixe: (A - sedimento (S), B - sedimento e água do mar (SAM) e C - água do mar (AM)). Adaptação de: www.google.com.br.

2.2.3 Isolamento dos microrganismos

Os microrganismos foram isolados das três amostras do item 2.2.2, pela técnica de enriquecimento por pressão seletiva, com base em COLLA *et al.*, (2014); DENG *et al.*, (2014) e caracterizados por morfotipos celulares e coloração de Gram (GARRITY *et al.*, 2005). Cada amostra (S, SAM e AM) foi inoculada em triplicatas biológicas. A técnica consistiu na incubação de 2 % (m/v) de amostra (S, SS e/ou SW) em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de água do mar estéril suplementada com 2 % (v/v)

de petróleo Bazu como única fonte de carbono e energia. As amostras foram incubadas a 30 °C em plataforma rotatória (200 rpm). Uma alíquota (1 mL de cada inóculo) foi transferida a cada 7 dias para um novo frasco contendo 50 mL de água do mar estéril (autoclavado por 20 min a 121 °C e 1 atm) com 2 % (v/v) de petróleo Bazu. Após 3 transferências consecutivas, foram realizadas diluições seriadas e a técnica de esgotamento para a obtenção de colônias puras em Placas de Petri com meio de cultura YPD (2 % de glicose, 2 % de pepitona, 1 % de extrato de levedura, ambos Sigma-Aldrich e 2 % de ágar bacteriológico, Invitrogen).

2.2.4 Testes preliminares para a avaliação do potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo pelos microrganismos

2.2.4.1 Pré-inóculo e esgotamento das reservas energéticas

O pré-inóculo dos isolados foi preparado transferindo uma alçada da cultura armazenada para um balão Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meio YPD estéril. Os frascos foram incubados por 24 h, 30 °C a 200 rpm. As células foram centrifugadas a 8960 \times g por 10 min a 10 °C e lavadas duas vezes com solução de NaCl (0,85 % m/v) estéril. O sedimento de células obtido foi suspenso em 20 mL de NaCl (0,85 % m/v) estéril e novamente incubado sob as mesmas condições, a fim de realizar o esgotamento das reservas energéticas (*starvation*) dos isolados (CERQUEIRA *et al.*, 2012; DÖRR DE QUADROS *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2017).

2.2.4.2 Indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

O potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo pelos isolados foi avaliada com o indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), com base em BRADDOCK & CATTERALL (1999); CERQUEIRA *et al.*, (2012); ALMEIDA *et al.*, (2017). Os experimentos foram realizados em triplicatas, utilizando placas de poliestireno de 24 poços estéreis para a inoculação dos isolados, com concentração inicial de 10^8 UFC/mL, 25 % de TTC (filtrado em membranas de 0,22 μ m), 85 % de meio mineral estéril MM1 [composição em g/L: KCl, 0,7; KH_2PO_4 , 2,0; Na_2HPO_4 , 3,0; NH_4NO_3 , 1,0; solução de micronutrientes, 1 mg/L (MgSO_4 , 4,0; FeSO_4 , 0,2; MnCl_2 , 0,2; CaCl_2 , 0,2)] (RICHARD & VOGEL, 1999) e 2 % de petróleo Bazu, como única fonte de carbono e energia, para o volume de 1200 μ L de inóculo. Como controle positivo, foi utilizado o *Bacillus amyloliquefaciens* MO13 MORO *et al.*, (2018) e o negativo, sem isolado, respectivamente. As placas foram incubadas no escuro para evitar a foto-oxidação do TTC, a 28 °C por 144 h e homogeneizadas a 400 rpm (*ThermoMix*) a cada 24 h. Os isolados que propiciaram a mudança na cor do inóculo (incolor para rosa) foram selecionados para testes posteriores.

2.2.4.3 Produção de biossurfactantes

Para avaliar a capacidade dos microrganismos em produzirem biossurfactantes, o teste do CTAB e azul de metileno foi realizado como descrito por SIEGMUND & WAGNER (1991); BODOUR & MAIER (2002). Os meios de cultura continham peptona, 0,14 %, glicerol, 3,13 %, brometo de cetiltrimetilamônio, 0,02 %, azul de metileno, 0,005 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 %, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 %, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 %, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

0,0005 % e ágar a 1,5 % (RAHMAN *et al.*, 2010). As placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 MORO *et al.*, (2018), foi utilizada como controle positivo.

2.2.4.4 Capacidade do microrganismo de acessar a fonte de carbono em meio sólido

A capacidade do microrganismo de acessar a fonte de carbono em meio sólido foi avaliada com base em ARULAZHAGAN & VASUDEVAN (2011); ALMEIDA *et al.*, (2017). Os isolados foram inoculados pela técnica de espalhamento superficial em placa de Petri com meio mineral Bushnell-Haas (BH) contendo 0,02 % MgSO₄, 0,002 % CaCl₂, 0,1 % KH₂PO₄, 0,1 % K₂HPO₄, 0,1 % NH₄NO₃, 0,005 % FeCl₃, 2 % ágar, em pH 7, suplementado com 0,02 % de petróleo Bazu, como única fonte de carbono e energia. Estes inóculos foram incubados a 28 °C por 7 dias.

2.2.5 Identificação molecular dos microrganismos selecionados

A identificação molecular dos microrganismos selecionados foi realizada com base no sequenciamento parcial dos genes 16S rRNA e 5.8S rRNA, para bactérias e leveduras, respectivamente (WHITE *et al.*, 1990; MULET *et al.*, 2012; TOJU *et al.*, 2012; DENG *et al.*, 2014; ZAFRA *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017; ZAFRA *et al.*, 2017; TKAVC *et al.*, 2018).

Os isolados foram cultivados em 50 mL de meio líquido YPD por 24 h, a 30 °C em plataforma rotatória (200 rpm). A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o método descrito por SAMBROOK & RUSSELL (2001). O fragmento correspondente à

uma porção do gene 16S rRNA (1465 pb), foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* 16F27 (sequência: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') e 16R1492 (sequência: 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACT T-3') (MULET *et al.*, 2012). A reação da PCR foi realizada com os seguintes componentes: 1 µL de DNA genômico (50 ng/µL), 5 µL de dNTP (1 mM), 2 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 5 µL de tampão 10X High Fidelity, (10 mM de tris-HCl pH 8, 50 mM KCl), 2 µL de MgSO₄ (50 mM), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase High Fidelity Platinum[®] (5 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e água deionizada para um volume final de 50 µL. As reações foram amplificadas em termociclador nas seguintes condições: 5 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C; 30 segundos a 55 °C, 2 min a 68 °C e 5 min a 68 °C.

Para a levedura, o fragmento correspondente ao gene 5.8S rRNA incluindo as regiões ITS e ITS (500 pb), foi amplificado por PCR com os *primers* ITS4 (sequência: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS5 (sequência: 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (ZAFRA *et al.*, 2014). A reação da PCR foi realizada com 1 µL de DNA genômico (50 ng/µL), 2,5 de dNTP (1 mM), 1 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 2,5 de µL tampão 10X, (10 mM de tris-HCl pH 8, KCl 50 mM), 1 µL de MgCl₂ (50 mM) e 0,1 µL de Taq DNA Polimerase Recombinant (5 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e água deionizada até um volume final de 25 µL. As reações foram amplificadas em termociclador nas seguintes condições: 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos (94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 1 min) e extensão de 72 °C por 5 min.

Os produtos das reações da PCR foram tratados enzimaticamente com Exonuclease I (Exo I, 1 U/µL, Takara) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP, 5 U/µL, Promega) de acordo com o protocolo de KIM & BLACKSHAW (2001). Para o volume de 50 µL da reação da PCR, foram utilizados Exo I (1,91 µL), SAP (1,86 µL) e 8,74 µL de água

desionizada. As amostras foram incubadas a 37 °C, por 40 minutos, para permitir a degradação dos *primers* e a desfosforilação dos dNTPs. Os controles negativos continham todos os componentes da PCR, exceto o DNA genômico. A integridade dos fragmentos amplificados, foi visualizada por eletroforese em gel de agarose (0,8 %) contendo brometo de etídio (1 mg/mL).

As quantificações dos produtos de PCR foram realizadas por análise fluorimétrica, utilizando o kit Qubit™ dsDNA HS fluorometer® (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento do DNA foi realizado pela empresa ACTGene, Molecular Analyses (Ludwig Biotechnology). As sequências foram alinhadas e comparadas com sequências nucleotídicas de espécies de referência, obtidas na base de dados EMBL/GenBank, utilizando o NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os cromatogramas obtidos foram analisados no programa ChromasPro 1.5.

2.2.6 Extração dos hidrocarbonetos alifáticos do petróleo Bazu

2.2.6.1 Limpeza da vidraria

Todas as vidrarias empregadas nas etapas de cromatografia líquida preparativa foram submetidas ao procedimento de limpeza, para evitar a contaminação das amostras. As vidrarias foram lavadas com detergente comercial (lava louça), enxaguada em água corrente, água deionizada e acetona. Por fim, mantidas em forno à 300 °C por 3 horas (FERREIRA *et al.*, 2012; DÖRR DE QUADROS *et al.*, 2016).

2.2.6.2 Cromatografia líquida preparativa

Os hidrocarbonetos alifáticos foram extraídos do petróleo Bazu por fracionamento, utilizando uma coluna empacotada por emulsão, adaptado de FERREIRA *et al.*, (2012); DÖRR DE QUADROS *et al.*, (2016). Todos os adsorventes utilizados estavam livres de umidade, previamente secos em estufa. Os adsorventes foram submetidos a 200 °C para SiO₂ (Fluka, 220-440 mesh), a 400 °C para Al₂O₃ (Merck, 70-230 mesh), durante 3 h e o Na₂SO₄ (Sigma-Aldrich, 99 %) durante 4 h a 400 °C. A lã de vidro foi submetida ao processo de limpeza com o solvente hexano (Sigma-Aldrich, 99 %) utilizando o extrator Soxhlet, por 8 horas com 4 ciclos por hora (FERREIRA *et al.*, 2012; DÖRR DE QUADROS *et al.*, 2016). O fracionamento do petróleo Bazu foi realizado em duas etapas. Na etapa inicial, 2,5 g de petróleo bruto foram fracionadas em uma coluna de vidro (80 mm d.i. x 400 mm) previamente preparada por empacotamento com hexano (50 mL) misturado a 15 g de SiO₂, obtendo o extrato de saturados bruto (ESB). Este ESB foi novamente fracionado em uma segunda coluna de vidro (150 mm d.i x 350 mm), empacotada com hexano (50 mL), misturando na sequência 10 g de SiO₂, 6 g de Al₂O₃ e 4 g de Na₂SO₄, obtendo o extrato de saturados (ES). O solvente dos extratos foi extraído por rotaevaporador (58 °C, 400 mmHg por 10 min). A massa do ES foi determinada pela diferença de massa (massa final do frasco com o ES, menos a massa inicial do frasco) e a concentração dos hidrocarbonetos alifáticos no ES, foi determinada por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (GC-FID) conforme descrito no item 2.2.12.2, para posterior aplicação como contaminante nos experimentos de biodegradação no item 2.2.7. Para este experimento foram realizadas 10 replicatas.

2.2.7 Testes de biodegradação dos hidrocarbonetos

Os testes de biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs pelos isolados, foram realizados com base em ARULAZHAGAN & VASUDEVAN (2011); DENG *et al.*, (2014); McFARLIN *et al.*, (2014); PUGAZHENDI *et al.*, (2017). Os microcosmos (20 mL) foram preparados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 10^5 UFC/mL de células bacterianas inoculadas em água do mar estéril (pH 8,1). Os contaminantes que fizeram parte dos inóculos foram uma mistura de diferentes hidrocarbonetos alifáticos (Extrato de alifáticos solubilizados em hexano) e de PAHs (naftaleno, antraceno, fenantreno e pireno, de concentrações iguais; solubilizados em diclorometano), na proporção de 0,1 % m/v. Estes experimentos foram realizados separados para cada classe de contaminantes. A água do mar e os isolados somente eram adicionados aos inóculos após a evaporação completa dos solventes (em temperatura ambiente no fluxo laminar). Os inóculos foram incubados a 30 °C, 200 rpm por 46 dias. Cada condição foi avaliada em triplicatas biológicas. O controle abiótico foi utilizado em todos os experimentos.

2.2.8 Ensaio do desenvolvimento bacteriano

A técnica de microgota foi aplicada para determinar as células viáveis (expresso em UFC/mL) em suspensão, durante o período de biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos e dos PAHs, de 0 a 1104 h (46 dias), adaptado de CHEN *et al.*, (2003); NAGHILI *et al.*, (2013). Os microcosmos foram incubados conforme descrito no item 2.2.7. O desenvolvimento bacteriano também foi avaliado sem adição de contaminantes (controle), somente na presença de água do mar estéril. Diluições seriadas foram realizadas em NaCl

(0,85 % m/v) estéril e de 10 µL foram inoculados em placas de Petri com meio de cultura YPD ágar, divididas em quatro quadrantes. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h. Determinou-se o número de CFU (mínimo de 3 e máximo de 30 colônias/quadrante). A contagem da CFU foi realizada em triplicatas biológicas. O controle abiótico foi usado em todos os experimentos.

2.2.9 Monitoramento do desenvolvimento bacteriano em tempo real

Esta técnica de monitoramento do desenvolvimento bacteriano em tempo real, foi desenvolvida no laboratório pelo grupo sob o título de “*Scanner-based time-lapse petroleum biodegradation*”. Uma fina camada de contaminantes (hidrocarbonetos alifáticos e/ou mistura de PAHs de concentração inicial de 20 mg/mL) foi pulverizada sobre o meio mineral BH ágar, adaptado de KIYOHARA *et al.*, (1982); ARULAZHAGAN *et al.*, (2010); ARULAZHAGAN & VASUDEVAN (2011), com o emprego de um borrifador de vidro estéril. A névoa contendo o contaminante foi produzida sob a pressão de 1,5 kgf/cm² de N₂. Os inóculos das bactérias foram preparados por lavagem das células duas vezes em solução de NaCl 0,85 % m/v estéril, como descrito no item 2.2.4.1, sem a realização da etapa de esgotamento das reservas energéticas. A concentração das células foi ajustada para DO_{600 nm} 0,2. O volume de 5 µL foi pipetado na superfície da placa de Petri previamente preparada e incubado por 240 h a 30 °C. O desenvolvimento das colônias foi fotografado automaticamente (*time-lapse*) a cada 2 h usando um scanner fotográfico Epson Perfection V800.

2.2.10 Determinação das medidas de tensão superficial, índice de emulsificação e pH

Para estes experimentos, o sobrenadante de 46 dias de incubação do inóculo microbiano foi obtido após a remoção das células por centrifugação a 8960 xg por 10 min a 10 °C. A determinação do pH do sobrenadante do meio de cultura foi realizado com um Phmetro digital (Jenway 3505), imediatamente à extração das células dos inóculos. O percentual do índice de emulsificação em 24 h (IE_{24h}%) foi realizado para avaliar a formação de emulsões pelos biossurfactantes de alto peso molecular, de acordo com o método de COOPER & GOLDENBERG (1987); CERQUEIRA *et al.*, (2011). Neste ensaio, em um tubo de vidro de fundo plano (15 mm x 150 mm) contendo de 2 mL de querosene, é adicionado 2 mL do inóculo livre de células e misturados com Vortex, por 2 min. Os tubos foram incubados de forma estática por 24 h à temperatura ambiente e após esse período, o IE_{24h}% foi determinado como (altura da camada de emulsão/altura total) x 100. A análise da tensão superficial foi realizada usando um medidor digital de tensão superficial (Gibertini, Milão, Itália), empregando o método de placa de Wilhelmy. Água destilada (72,1 mN/m) e etanol (24 mN/m) foram utilizados como padrões para a calibração do equipamento, de acordo com CERQUEIRA *et al.*, (2011).

2.2.11 Identificação molecular dos biossurfactantes

Os biossurfactantes foram extraídos com base em MORO *et al.*, (2018). O sobrenadante obtido do item 2.2.7, livre de células foi obtido após a centrifugação do inóculo a 8960 xg por 10 min a 10 °C. Este sobrenadante foi acidificado com uma solução de HCl 0,1 M até atingir pH = 2 e mantido por 24 h a 4 °C para precipitação completa dos

biossurfactantes. Em seguida, os biossurfactantes foram extraídos três vezes com clorofórmio/metanol (2:1 v/v) em um funil de separação para extração dos compostos orgânicos (fase inferior). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida (45 °C, 400 mmHg por 10 min), e o soluto foi solubilizado com uma mistura de acetonitrila e água desionizada (1:1 v/v). Esta solução foi acidificada (0,1 % de ácido fórmico), filtrada através de uma membrana de PVDF de 0,45 µm e introduzida no espectrômetro de massa (Q-TOF-MS; Bruker® Daltonics, Impact II) por infusão direta em um fluxo, a taxa de 180 µL/h. O Q-TOF-MS foi operado em modo de ionização positiva sob as seguintes condições: capilar 4500 V, nebulizador 0,3 bar (N₂), gás de secagem 4 L/min (N₂) e temperatura do gás a 200 °C. Todas as informações foram registradas na faixa de razão massa carga (*m/z*) de 50 a 1300 e a calibração do espectrômetro de massas foi realizada com solução de formiato de sódio. Os dados das análises foram processados com o software DataAnalysis 4.2. Um desvio de massa erro de ± 5 ppm foi atribuído para a composição elementar dos íons (BRENTON & GODFREY, 2010).

2.2.12 Determinação da biodegradação e teste de recuperação dos hidrocarbonetos

2.2.12.1 Extração dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs dos meios de cultivo

Os hidrocarbonetos alifáticos e os PAHs presentes nos meios de cultivo, que não foram metabolizados até o quadragésimo sexto dia de incubação, foram extraídos por 3 extrações sucessivas líquido-líquido de 20 mL cada. Para os hidrocarbonetos alifáticos se utilizou apenas hexano e para os PAHs se utilizou uma solução de hexano/diclorometano (3:2 v/v). A umidade presente na fase orgânica após as extrações foi removida utilizando 4

g de sulfato de sódio anidro (PUGAZHENDI *et al.*, 2017). O extrato foi concentrado sob pressão reduzida (45 °C, 400 mmHg por 10 min), (aproximadamente 2 mL). Esse volume foi novamente concentrado em frascos do tipo *vial* sob fluxo de nitrogênio (0,1 kgf/cm²) até a remoção de todo o solvente. Finalmente, os *vials* foram transferidos para um dessecador por 12 h para posterior análise por GC-FID.

2.2.12.2 Determinação dos percentuais de biodegradação

Os alifáticos e os PAHs foram quantificados por GC-FID em um cromatógrafo PerkinElmer Clarus 600 equipado com injetor automático Built-in Auto-Sampler acoplado. As amostras foram injetadas (1 µL) em modo split (10:1) com gás de arraste (N₂) em fluxo constante de 1,3 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram 280 e 310 °C, respectivamente. Se utilizou uma coluna capilar Petrocol[®] DH 50.2, (5 % fenil, 95 % dimetilpolisiloxano, com 50 m, 0,20 mm d.i. x 0,50 mm). Para os hidrocarbonetos alifáticos, a temperatura inicial do forno foi de 70 °C durante 3 min. A rampa de aquecimento foi na taxa de 30 °C/min até 310 °C, mantida a esta temperatura por 49 min. Para análise dos PAHs, a temperatura inicial do forno foi de 190 °C por 2 min. A taxa de aquecimento da primeira rampa foi de 8 °C/min até 200 °C por 2 min. A segunda rampa de aquecimento foi de 10 °C/min até 260 °C por 1 min. A última rampa foi de 15 °C/min até 310 °C e permaneceu por 19,42 min.

A identificação da composição de hidrocarbonetos alifáticos e PAHs se baseou nos seus respectivos tempos de retenção (*t_r*), em comparação com os padrões analíticos (Apêndice A, Figura AAA-1). Para tanto, se utilizou uma mistura de padrões de alcanos alifáticos saturados do C8-C33 (Supelco, 1000 µg/mL), pristano (Sigma-Aldrich, 98 %) e

fitano (Sigma-Aldrich, 95 %). Para os PAHs, foi uma mistura de 16 PAHs (Supelco, 2000 µg/mL) prioritários (DÖRR DE QUADROS *et al.*, 2016) (Apêndice A, Figura AAB-1). As análises quantitativas foram realizadas utilizando o método de padronização externa, adaptado de HERZFELDER & GOLLEDGE (2004); ALY SALEM *et al.*, (2014). Os padrões externos usados para construir as curvas de calibração na faixa de concentração de 2 a 1000 ng/µL, foram o undecano para os hidrocarbonetos alifáticos do C8 a C14, pristano (C15 a C21) e heptacosano (C22 a C33). Para os PAHs, foram o naftaleno, antraceno, fenantreno e pireno, utilizados como padrões externo. Os coeficientes de correlação linear ($R^2 \geq 0,996$) foram adequados para todas as curvas de calibração (Apêndice A, Figuras AAC-1 a AAC3). A porcentagem de biodegradação foi calculada com base na Equação 01.

$$Bp = [(C_i - C_f)/C_i] \times 100 \quad (01)$$

Onde B_p , C_i e C_f são o percentual de biodegradação no final do tempo de incubação, a quantidade de contaminante no início da incubação e a quantidade de contaminante no final da incubação, respectivamente (ROY *et al.*, 2018).

2.2.12.3 Teste de recuperação dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs

O teste de recuperação dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs foi realizado de acordo com o item 2.2.7, em triplicatas, por 120 h e sem a presença de microrganismos, para avaliar a eficiência dos métodos de extração, purificação e concentração das amostras, com base em FERREIRA *et al.*, (2012). Entretanto, as concentrações das misturas dos contaminantes neste teste, foram de 20 % em comparação com a concentração inicial dos contaminantes do

item 2.2.7. O teste de recuperação foi calculado como: (média do analito recuperado/quantidade analito inicial) x 100.

2.2.13 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm o desvio padrão, empregando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pela multicomparação de Tukey.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Isolamento dos microrganismos com potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo

O interesse em isolar e caracterizar microrganismos com capacidade de biodegradar hidrocarbonetos de petróleo, é estimulado pela distribuição antropogênica deste e seus efeitos potencialmente deletérios para a saúde humana, animal e o meio ambiente (EBADI *et al.*, 2017; KOTZAKOULAKIS & GEORGE, 2018). Em ambientes contaminados por hidrocarbonetos, a microbiota autóctone passa por um processo de adaptação. Durante esse período, a resistência aos contaminantes advindos do petróleo ocorre por meio de pressão natural. Através de incorporações gênicas originadas por mutações ou transferência gênica horizontal, o potencial genético da microbiota é melhorado, resultando em uma maior competência enzimática, responsável pelas vias de biodegradação dos poluentes, utilizando-os como fonte de carbono e energia (MAIER & GENTRY, 2015; ABBASIAN *et al.*, 2016). Para obter microrganismos com capacidade de biodegradar hidrocarbonetos de petróleo, amostras ambientais foram coletadas no PNLP. Essa região de amostragem foi escolhida devido à convergência das correntes oceânicas (origem da zona intertropical), que transportam os hidrocarbonetos de petróleo, em decorrência dos derramamentos que ocorrem nas regiões sul e sudeste do Brasil (BOLLMANN *et al.*, 2010).

Para a obtenção de microrganismos com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo foi aplicada a técnica de enriquecimento por pressão seletiva às amostras ambientais de S, SAM e AM, obtidas no PNLP. A microbiota presente nestas amostras foi submetida à água do mar contaminada com 2 % de petróleo Bazu como única

fonte de carbono. Após 21 dias de incubação, 57 microrganismos foram isolados. Entre estes, 25 microrganismos foram pré-selecionados por diferenciação de morfologias para os testes posteriores. Destes, 16 isolados foram obtidos da amostra S, sendo 15 bactérias e 1 levedura, 4 bactérias da amostra SAM e 5 bactérias da amostra AM. A coloração de Gram demonstrou que em sua quase totalidade (13), são bacilos gram negativos, 5 bacilos gram positivos e 6 cocos gram positivos, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Morfologia celular e coloração de Gram dos 25 microrganismos isolados pré-selecionados.

Isolado	Morfologia	Gram	Isolados	Morfologia	Gram
SAMPNLPB1	B	-	SPNLPB14	B	-
SPNLPLE2	L	+	SPNLPB15	B	-
SAMPNLPB3	B	-	SPNLPB16	C	+
SAMPNLPB4	B	-	SPNLPB17	B	-
SAMPNLPB5	B	+	SPNLPB18	B	-
SPNLPB6	B	+	SPNLPB19	B	-
SPNLPB7	B	-	SPNLPB20	B	-
AMPNLPB8	C	+	AMPNLPB21	B	+
AMPNLPB9	C	+	SPNLPB22	C	+
SPNLPB10	B	-	SPNLPB23	C	+
SPNLPB11	B	-	SPNLPB24	C	+
AMPNLPB12	B	+	AMPNLPB25	B	-
SPNLPB13	B	+			

Símbolos: sedimento (S), sedimento e água do mar (SAM), água do mar (AM), bactéria# (B#), levedura (LE#), Parque Nacional da Lagoa do Peixe (PNLP), coco (C), bacilo (B), levedura (L), positivo (+) e negativo (-).

2.3.2 Seleção dos microrganismos

Os microrganismos pré-selecionados foram submetidos aos testes do indicador redox TTC, produção de biosurfactantes e capacidade de utilizar a fonte de carbono em meio sólido, com o propósito de avaliar o potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo. No teste do indicador redox, o TTC atua como um receptor artificial de elétrons

durante o metabolismo microbiano, promovendo a mudança de cor do inóculo de incolor (forma oxidada) a rosa (forma reduzida) (BRADDOCK & CATTERALL (1999); RICHARD & VOGEL (1999); BENTO *et al.*, (2005); CERQUEIRA *et al.*, (2011 e 2012); COLLA *et al.*, (2014); MEYER *et al.*, (2014); DÖRR DE QUADROS *et al.*, (2016); ALMEIDA *et al.*, (2017). Os isolados passaram previamente pelo processo de ausência de fonte de carbono (*starvation*), a fim de realizar o esgotamento das reservas energéticas para garantir que resultados falso-positivos não ocorressem (CERQUEIRA *et al.*, 2012; COLLA *et al.*, 2014). Após 144 h de incubação, 72 % dos microrganismos testados apresentaram resultados positivos, médios (+), bons (++) e excelentes (+++), como apresentados na Tabela 3. Apenas 28 % dos isolados apresentaram resultados negativos, não demonstrando potencial para biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo.

Outro critério para selecionar linhagens microbianas capazes de metabolizar compostos recalcitrantes, passa pela avaliação de verificar a produção de biossurfactantes para biodisponibilizar hidrocarbonetos de petróleo durante a biodegradação. O método CTAB/azul de metileno indica a produção de biossurfactantes extracelulares (SIEGMUND & WAGNER, 1991). Os resultados demonstraram que 84 % dos isolados são capazes de produzir biossurfactantes, apresentando resultados médios (+) a excelentes (+++) (Tabela 3). Como os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes são moléculas anfifílicas constituídas de uma extremidade polar (hidrofílica) e outra extremidade não-polar (hidrofóbica).

Tabela 3. Resultados dos testes preliminares quanto ao desenvolvimento (TTC e BH-Bazu) e produção de biossurfactante (CTAB/AM) com os isolados pré-selecionados.

Isolado	TTC ^(a)	CTAB/AM ^(b)	BH/Bazu ^(c)
SAMPNLPB1	+	++	-
SPNLPLE2	+	++	+
SAMPNLPB3	++	+	-
SAMPNLPB4	++	+++	-
SAMPNLPB5	++	+++	+
SPNLPB6	++	-	-
SPNLPB7	++	+++	+
AMPNLPB8	++	+	-
AMPNLPB9	-	+++	-
SPNLPB10	+++	+++	-
SPNLPB11	+++	+++	-
AMPNLPB12	+	+++	-
SPNLPB13	+++	+++	-
SPNLPB14	+	+	-
SPNLPB15	++	+++	-
SPNLPB16	-	+++	-
SPNLPB17	-	++	-
SPNLPB18	++	+	-
SPNLPB19	-	+	-
SPNLPB20	-	-	-
AMPNLPB21	++	+++	+
SPNLPB22	-	+++	-
SPNLPB23	++	-	-
SPNLPB24	-	-	-
AMPNLPB25	++	+++	+
CP_TTC ^(d)	+		
CP_CTAB/AM ^(e)		++	
CN	-		

Símbolos: (-) sem resultados; (+) resultados médios; (++) resultados bons e (++++) resultados excelentes.

(a) Teste do indicador redox TTC alterou o meio do inóculo em até 48 h.

(b) Teste do CTAB/Azul de metileno para a produção de biossurfactante.

(c) Meio mineral Bushnell-Haas suplementado com 0,02 % de petróleo Bazu.

(d) CP_TTC: Controle positivo (*Bacillus amyloliquefaciens* MO13).

(e) CP_CTAB/AM: Controle positivo (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e CN: controle negativo.

A presença destes biossurfactantes aniônicos em solução pode ser determinada com base na formação de sais insolúveis com substâncias catiônicas, como CTAB. Eles formam íons insolúveis em solução, que se precipitam em torno do microrganismo, formando um alo

azul-escuro contra um fundo azul-claro (meio de cultura), determinando microrganismos produtores de biossurfactantes (RAHMAN *et al.*, 2010).

No entanto, no teste com o meio mineral Bushnell-Haas suplementado com 0,02 % de petróleo Bazu, apenas 20 % dos isolados (SPNLPLE2, SAMPNLPB5, SPNLPB7, AMPNLPB21 e AMPNLPB25) foram capazes de formar colônias (Tabela 3). Assim, estes isolados demonstraram capacidade de se adaptarem ao meio e de utilizar os hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono e energia disponível para seu metabolismo. Os isolados que apresentaram resultados positivos nos três testes preliminares foram identificados pela técnica de identificação molecular e submetidos aos testes de biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos policíclicos.

2.3.3 Identificação molecular dos microrganismos selecionados

Após os testes preliminares, os 5 microrganismos selecionados com potencial de biodegradar os hidrocarbonetos de petróleo foram identificados pela análise da sequência parcial dos genes 16S rRNA e 5.8S rRNA. Os isolados SAMPNLPB5, SPNLPB7 e AMPNLPB25 são, com base nos resultados de identidade ≥ 99 %, como: *Bacillus methylotrophicus*, *Pseudomonas sihuiensis* e *Ancylobacter polymorphus*, respectivamente (Tabela 4). Segundo XIN *et al.*, (2006); LANG *et al.*, (2008); WU *et al.*, (2014); GE *et al.*, (2016), são bactérias não patogênicas. No entanto, dois isolados (SPNLPLE2 e AMPNLPB21) pertencem ao gênero *Candida parapsilosis* e *Brevibacterium sanguinis*, (Tabela 4) ambos patogênicas (WAUTERS *et al.*, 2004; TROFA *et al.*, 2008) e foram desconsideradas para os experimentos de biodegradação. Os produtos (*Contigs*) dos sequenciamentos estão demonstrados no Apêndice A (Contigs AAD-1 a AAD-5).

Tabela 4. Identificação molecular dos microrganismos isolados e selecionados das amostras do PNLP.

Isolado	Identificação	Identidade (%)	Nº de acesso no GenBank
SPNLPLE2	<i>Candida parapsilosis</i>	100	LC390138.1
SAMPNLPB5	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	99	JQ023622.1
SPNLPB7	<i>Pseudomonas sihuiensis</i>	99	LT629797.1
AMPNLPB21	<i>Brevibacterium sanguinis</i>	99	KF963622.1
AMPNLPB25	<i>Ancylobacter polymorphus</i>	99	NR_042795.1

2.3.4 Extração e composição dos hidrocarbonetos saturados do petróleo Bazu

A extração dos hidrocarbonetos do petróleo bruto Bazu, utilizando uma fase estacionária polar e o solvente hexano como eluente, extraiu a fração leve do petróleo que é constituído de 56,7 % de hidrocarbonetos alcanos saturados (Tabela 5). Os demais 43,3 % são compostos de aromáticos, resinas e asfaltenos, a fração pesada do petróleo (ZHU *et al.*, (2001). Segundo BATA *et al.*, (2018), o petróleo bruto extraído da Bacia de Sergipe-Alagoas é constituído de saturados (59,4 %), aromáticos (10 %), resinas (15,4 %) e asfaltenos (15,1 %), em média. O petróleo bruto é uma mistura extremamente complexa de hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos) e não-hidrocarbonetos, como o contendo enxofre, nitrogênio, oxigênio e vários traços de metais (RENGARAJAN *et al.*, 2015; NARDELI *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2018; MAHJOUBI *et al.*, 2018).

A extração dos hidrocarbonetos do petróleo Bazu foi realizada com o objetivo de obter um tipo específico de contaminante para um dos testes de biodegradação, os hidrocarbonetos alifáticos. Os resultados da análise por GC-FID da composição do extrato de saturados (ES) extraído após o processo de fracionamento do petróleo Bazu (Tabela 6)

demonstrou que a faixa dos alcanos alifáticos saturados de cadeia média (C8 a C18), representam 65,2 % (m/m), quando comparados com os alcanos alifáticos saturados de cadeia longa (C19 a C33), com 34,8 % (m/m). Os isoprenóides identificados pristano e fitano, estes ramificados, correspondem a 3,3 e 2,3 % (m/m), respectivamente, do total de alifáticos.

Tabela 5. Resultados da extração dos hidrocarbonetos alcanos saturados do petróleo bruto Bazu.

n	Petróleo bruto (g)	ESB(g) ^(a)	ES(g) ^(b)	HAS(%)(^c)
1	2,5330	1,7716	1,4475	57,1
2	2,4911	1,7139	1,3901	55,8
3	2,5125	1,7836	1,4090	56,1
4	2,5317	1,7554	1,4501	57,3
5	2,4898	1,7819	1,4151	56,8
6	2,5100	1,7535	1,4109	56,2
7	2,5251	1,6335	1,4645	58,0
8	2,5170	1,6698	1,3991	55,6
9	2,4898	1,7418	1,4105	56,7
10	2,5579	1,6382	1,4620	57,2
Total	25,1579	17,2432	14,2588	
Média	2,5158	1,7243	1,4658	56,7
RSD (%)	0,8804	3,3446	3,2451	1,3

(a) ESB: Extrato de saturados bruto.

(b) ES: Extrato de saturados.

(c) HAS (%): Hidrocarbonetos alcanos saturados em percentual.

Mesmo após a realização dos processos de extração, o ES permaneceu com a “mistura complexa não resolvida” (UCM, *Unresolved Complex Mixture*), entre os alifáticos C8 e C26 (Figura 9). Com a utilização de técnicas avançadas de CG, como por exemplo a Cromatografia Gasosa Bidimensional acoplada a Espectrometria de Massa de Tempo-de-Vôo (GC × GC - TOF-MS), foi possível demonstrar que as UCMs são compostas de um

grande número de hidrocarbonetos com propriedades químicas iguais ou similares, consistindo principalmente de isômeros ramificados e cíclicos, alifáticos e aromáticos.

Tabela 6. Composição e concentração dos hidrocarbonetos alifáticos extraídos do petróleo Bazu e utilizados como contaminantes no teste de biodegradação.

Alifáticos	Nº/Carbono	Média ^(c) (ng/µL)	RSD (%)
Octano	C8 ^(a)	241,07	0,65
Nonano	C9 ^(a)	769,52	0,45
Decano	C10 ^(a)	1139,28	0,70
Undecano	C11 ^(a)	1488,15	0,85
Dodecano	C12 ^(a)	1580,60	0,91
Tridecano	C13 ^(a)	1354,93	0,91
Tetradecano	C14 ^(a)	1220,40	0,96
Pentadecano	C15 ^(a)	1160,36	1,07
Hexadecano	C16 ^(a)	902,86	1,19
Heptadecano	C17 ^(a)	840,19	1,02
Pristano	C19^(b)	619,39	1,41
Octadecano	C18 ^(a)	696,54	1,07
Fitano	C20^(b)	434,05	1,19
Nonadecano	C19 ^(a)	810,38	1,21
Eicosano	C20 ^(a)	638,45	1,25
Heneicosano	C21 ^(a)	550,90	1,16
Docosano	C22 ^(a)	506,88	1,13
Tricosano	C23 ^(a)	515,43	1,29
Tetracosano	C24 ^(a)	480,49	1,33
Pentacosano	C25 ^(a)	448,39	1,76
Hexacosano	C26 ^(a)	435,02	1,20
Heptacosano	C27 ^(a)	391,20	1,16
Octacosano	C28 ^(a)	364,31	1,27
Nonacosano	C29 ^(a)	282,79	1,22
Triacontano	C30 ^(a)	240,49	1,15
Hentriacontano	C31 ^(a)	172,92	1,04
Dotriacontano	C32 ^(a)	140,58	1,08
Tritriacontano	C33 ^(a)	106,15	0,65
Total		18531,72	

(a) Hidrocarbonetos alcanos alifáticos saturados não ramificados.

(b) Hidrocarbonetos alcanos alifáticos saturados ramificados.

(c) Média ± RSD (%), replicações: n = 10.

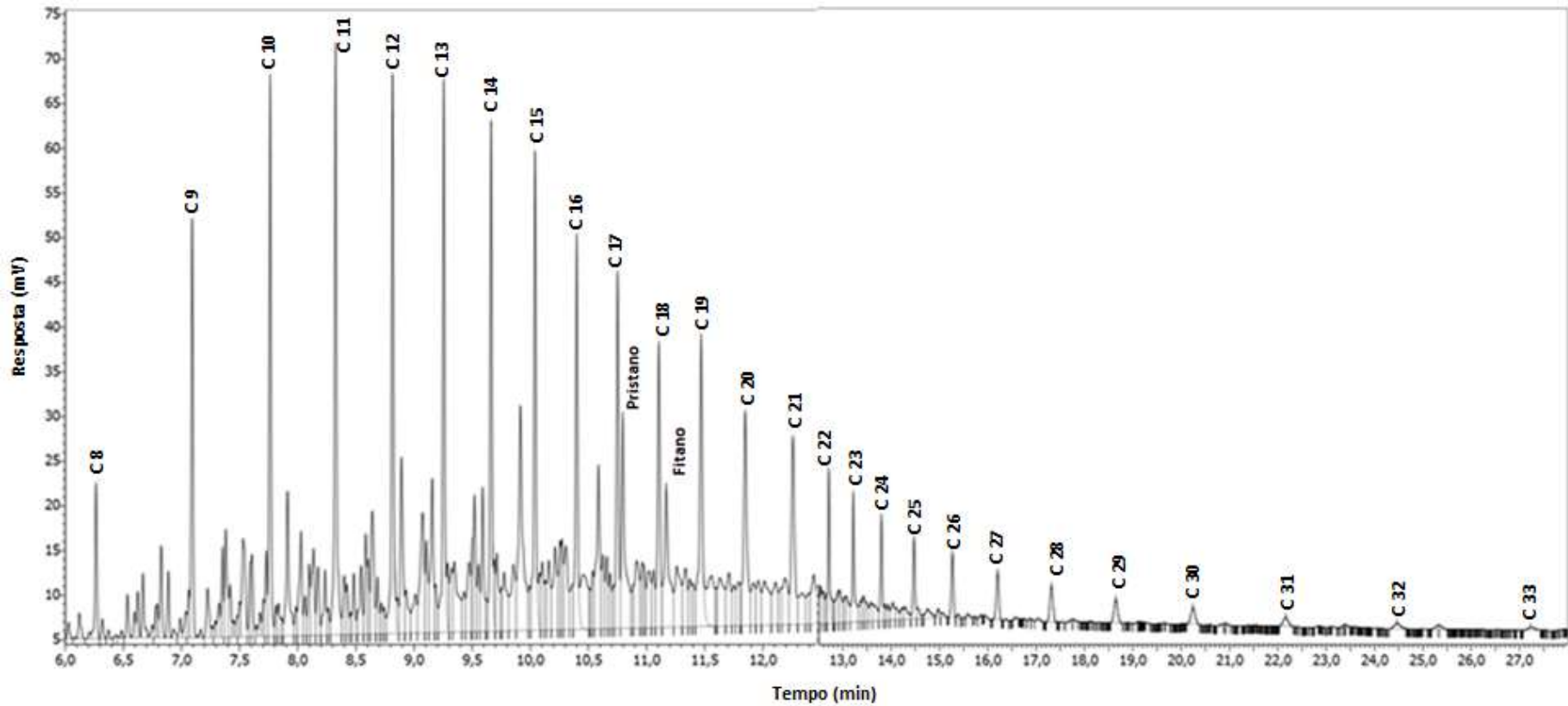


Figura 9. Perfil cromatográfico da fração de hidrocarbonetos alifáticos extraídos do petróleo Bazu. Cada pico identificado (Cn), representa um respectivo hidrocarboneto alifático não ramificado. Os isoprenóides pristano e fitano, também podem ser identificados. Os picos não identificados fazem parte da chamada “mistura complexa não resolvida” (UCM, *Unresolved Complex Mixture*).

Os saturados na UCM consistem principalmente de alcanos ramificados substituídos como os monoalquil resistentes (isoprenóides: 2,6,10-trimetiltridecano, 2,6,10-trimetilpentadecano, 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano) e 2,6,10,14-Tetrametilexadecano (fitano)), bem como compostos monocíclicos e bicíclicos (2-etildecahidro-naftaleno, hexilciclohexano, 1-etildecahidro-naftaleno, 2-propildecanaftaleno e heptiliciclo (VENTURA *et al.*, 2008, 2012; LI *et al.*, 2015). Os aromáticos são principalmente hidrocarbonetos aromáticos alquil-substituídos (1-metilnaftaleno, dimetil-, trimetil- e tetrametil-naftalenos) (HU *et al.*, 2018). A UCM é uma mistura de compostos significativos, característica comum dos petróleos que sofreram biodegradação (BATA *et al.*, 2018).

2.3.5 Avaliação do desenvolvimento microbiano durante o metabolismo dos contaminantes

O principal aspecto da biodegradação aeróbica de hidrocarbonetos de petróleo está associado ao desenvolvimento microbiano (FRITSCHÉ & HOFRICHTER, 2008; MAIER & GENTRY, 2015). A Tabela 7 apresenta a caracterização da água do mar de Salinas utilizada neste trabalho. Para um aumento microbiano exponencial, além do contaminante como fonte de carbono e energia, a água do mar fornece os minerais obrigatórios para todas as células (referidos por seus símbolos atômicos), como C, H, N, O, P, S, Mg e Zn, bem como os minerais necessários para a maioria das células, como K, Ca, Mn e Fe. Também, encontramos nesta análise (Br, B, F, Cl e Na) minerais necessários para funções especializadas em algumas células (MERCHANT & HELMANN, 2012). Além disso, a salinidade (34,6 ‰, 3,5 ‰) e pH (8,1) são fatores favoráveis à mineralização em ambientes

marinhos, transformando contaminantes orgânicos recalcitrantes em dióxido de carbono e água (DAS & CHANDRAN, 2011; PANIAGUA-MICHEL & ROSALES, 2015).

Tabela 7. Caracterização química da água do mar de Salinas usada deste estudo.

Componente	Espécie	Concentração (mg/L)	Metodologia
Majoritários			
Cloreto	Cl^-	19149,0	SMWW 22nd 4110 B,D
Sódio	Na^+	8300,0	EPA 200.7 Rev. 4.4
Bicarbonato	HCO_3^-	3324,5	AOAC – 9200.194
Sulfato	SO_4^{2-}	2537,0	SMWW 22nd 4110 B,D
Magnésio	Mg^{2+}	1100,0	EPA 200.7 Rev. 4.4
Potássio	K^+	480,0	EPA 200.7 Rev. 4.4
Cálcio	Ca^{2+}	390,0	EPA 200.7 Rev. 4.4
Brometo	Br^-	54,0	SMWW 22nd 4110 B,D
Estrôncio	Sr^{2+}	5,3	EPA 200.7 Rev. 4.4
Borato	$H_3BO_4^-$	4,2	SMWW 22nd 4500 B
Fluoreto	F^-	4,0	SMWW 22nd 4110 B,D
Minoritários			
Ortofósforo	HPO_4^{2-}	0,60	SMWW 22nd 4110 P,B,C,E
Lítio	Li^+	0,20	EPA 200.7 Rev. 4.4
Traço			
Ferro	Fe^{2+}	0,084	EPA 200.7 Rev. 4.4
Zinco	Zn^{2+}	0,010	EPA 200.7 Rev. 4.4
Manganês	Mn^{2+}	0,0086	EPA 200.7 Rev. 4.4
Nitrogênio e material orgânico			
DQO*		247,8	SMWW 22nd 5220 B
Nitrogênio amoniacal		0,06	SMWW 22nd 4110 B,C,F
Nitrogênio orgânico		2,61	SMWW 22nd 4110 C,N,F
Nitrogênio total		2,67	SMWW 22nd 4110 B,C,F

* DQO - Demanda Química de Oxigênio.

O método de pulverizar os contaminantes sobre o meio mineral sólido BH, que contém os minerais obrigatórios para o desenvolvimento celular, foi utilizado para avaliar a capacidade dos isolados em metabolizar estes recalcitrantes como única fonte de carbono e energia. Passadas 240 h após a incubação a 30 °C dos isolados de ambiente marinho sobre os hidrocarbonetos alifáticos, é possível classificá-los em ordem decrescente o B.

methylophilus > *P. sihuiensis* > *A. polymorphus*, pelo desenvolvimento celular e halo claro ao redor das colônias, Figura 10 (A, B e C).

Utilizando a mesma metodologia qualitativa para avaliar a capacidade dos isolados em metabolizar os PAHs, apenas os isolados *P. sihuiensis* > *B. methylophilus*, apresentaram desenvolvimento celular e halo claro ao redor das colônias, após 240 h de incubação a 30 °C. *A. polymorphus*, nas mesmas condições experimental, não apresentou desenvolvimento no decorrer do tempo de incubação, quando comparado com o controle (tempo zero) (Figura 11 A, B e C). Estes resultados corroboram com ARULAZHAGAN & VASUDEVAN (2011), que submeteu isolados microbianos (*Ochrobactrum* sp. VA1, *Enterobacter cloacae* e *Stenotrophomonas maltophilia*) de ambiente marinho a biodegradarem hidrocarbonetos de petróleo, quando pulverizados em meio mineral mínimo.

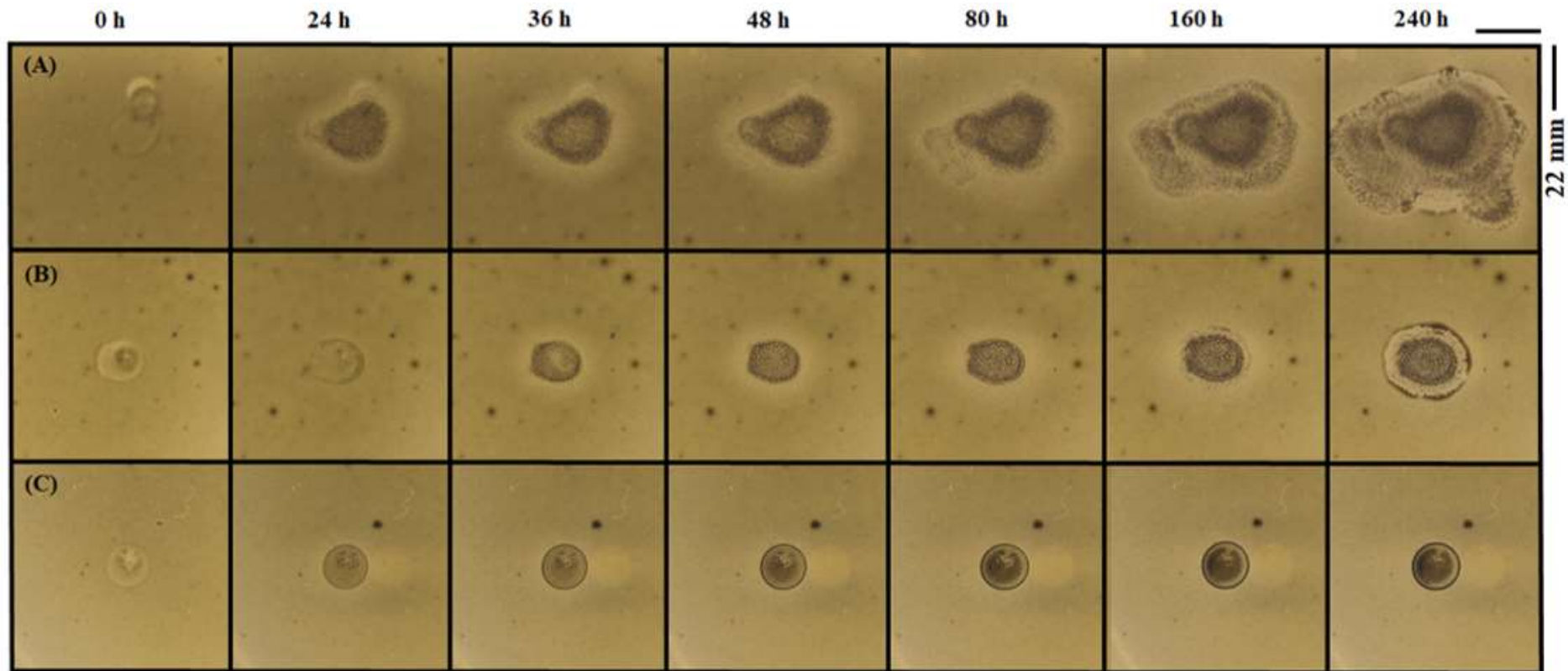


Figura 10. Desenvolvimento de *B. methylotrophicus* (A), *P. sihuiensis* (B) e *A. polymorphus* (C) em meio BH com petróleo. As bactérias foram inoculadas (30 °C) sobre o meio de mineral BH pulverizado com petróleo Bazu de concentração inicial de 20 mg/mL. As imagens dos inóculos foram obtidas nos tempos 0, 24, 36, 48, 80, 160 e 240 h.

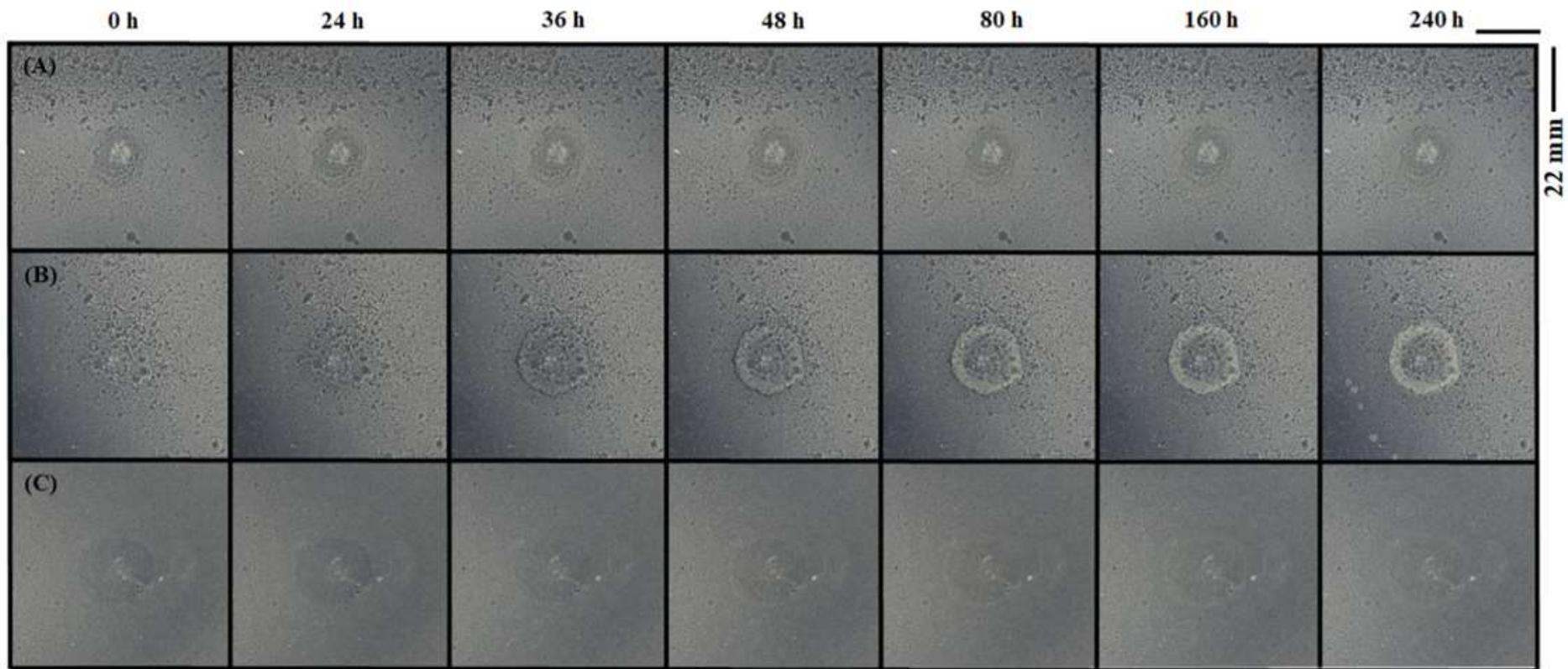


Figura 11. Desenvolvimento de *B. methylotrophicus* (A), *P. sihuiensis* (B) e *A. polymorphus* (C) em meio BH com PAHs. As bactérias foram inoculadas (30 °C) sobre o meio de mineral BH pulverizado com PAHs (20 mg/mL) (naftaleno, antraceno, fenantreno e pireno, de concentrações iguais; solubilizados em diclorometano). As imagens dos inóculos a 30 °C foram obtidas nos tempos 0, 24, 36, 48, 80, 160 e 240 h.

O desenvolvimento microbiano também foi avaliado durante o experimento de biodegradação em água do mar por quantificação das células viáveis expresso por UFC/mL. A Figura 12 A mostra o perfil de desenvolvimento celular dos isolados *B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e *A. polymorphus* na presença dos hidrocarbonetos alifáticos e de PAHs como contaminantes (proporção de 0,1% m/v) e na ausência destes (controle), por até 46 dias. Na Figura 12 A` a fase de latência foi de zero a 24 h e a fase exponencial de 24 a 48 h. Após este tempo de incubação, o número de células viáveis permaneceu constante (Figura 12 A), sugerindo que os microrganismos estavam na fase estacionária de desenvolvimento. Isto é confirmado pela condição controle, que a partir de 96 h (quarto dia) se observou um declínio no número de células viáveis. A fonte de carbono acessível e de similaridade estrutural ao carbono orgânico natural presente na água do mar (DQO: 247,8 mg/L; Tabela 7), foi metabolizada pelos microrganismos com o passar do tempo, como demonstrado na condição controle, Figura 12.

Até o término deste experimento, os microrganismos permaneceram viáveis, sugerindo o efetivo metabolismo dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs como fonte de carbono e energia, possivelmente pela atividade do aparato enzimático necessário à biodegradação destes contaminantes orgânicos. Estes resultados corroboram os estudos desenvolvidos por SWAATHY *et al.*, (2014), que avaliaram a capacidade de *Bacillus licheniformis* MTCC 5514, um isolado marinho, para biodegradar o antraceno em caldo *Zobell Marine*.

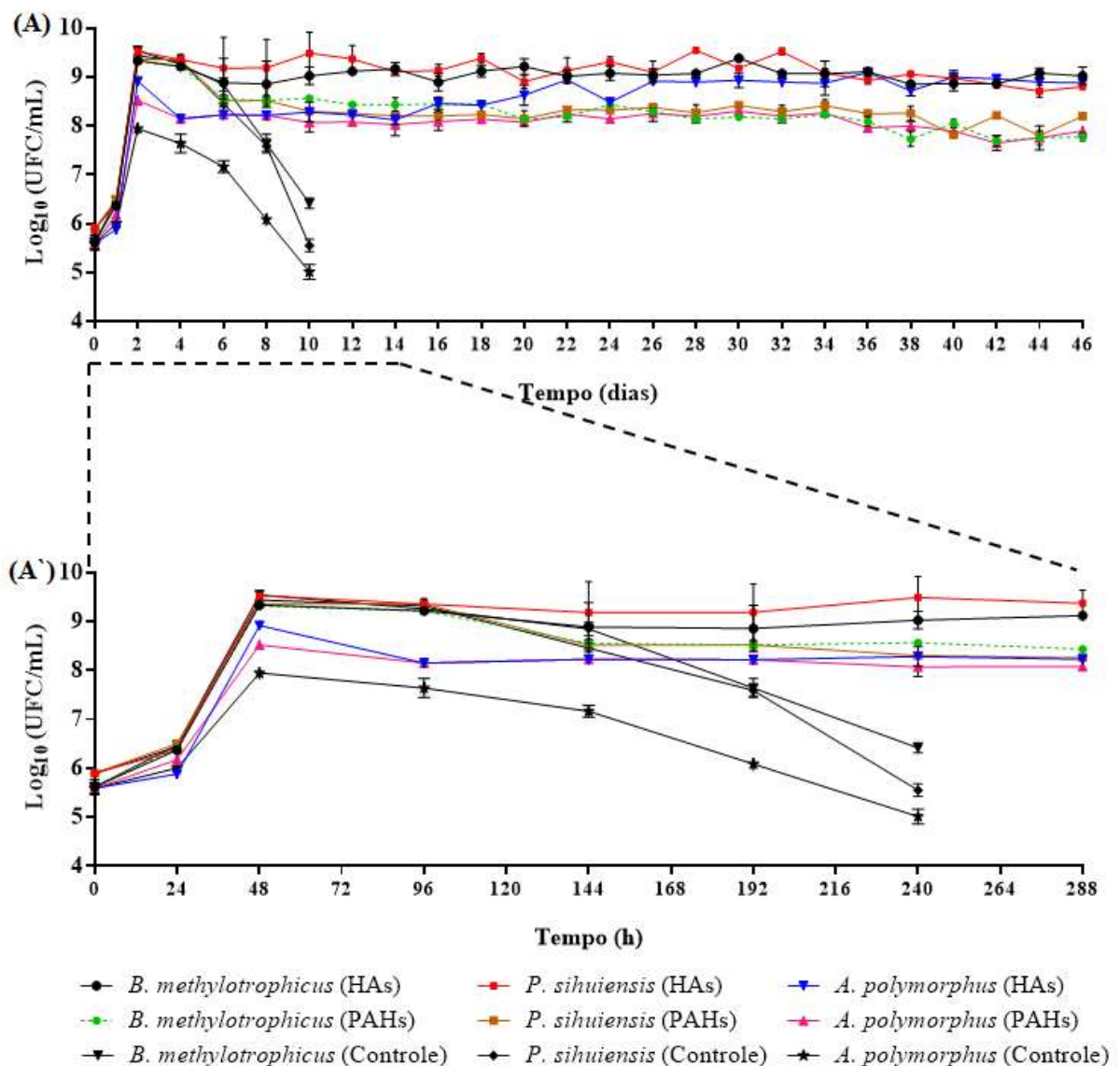


Figura 12 A e A'. Desenvolvimento celular das diferentes linhagens de *B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e *A. polymorphus* em água do mar contaminada por hidrocarbonetos de petróleo. Os microrganismos foram expostos a 0,1 % (m/v) de contaminantes como hidrocarbonetos alifáticos (HAs) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) em água do mar estéril. Para a condição controle, não foi adicionado contaminante. As amostras foram incubadas de 0 a 46 dias, a 30 °C e 200 rpm. As barras de erro representam a média \pm RSD (%) de três replicatas técnicas de três replicatas biológicas.

2.3.6 Identificação dos biossurfactantes

2.3.6.1 Lipopeptídeos produzidos por *Bacillus methylotrophicus*

A espectrometria de massa de alta resolução foi utilizada para identificar os biossurfactantes produzidos e utilizou-se o sistema de infusão direta através do Q-TOF-MS no modo de ionização positiva. A Tabela 8 apresenta duas famílias de lipopeptídeos cíclicos de cadeia lateral acíclica longa (surfactina e iturina) produzidos por *B. methylotrophicus* quando submetido ao teste de biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos em água do mar. As famílias de lipopeptídeos foram identificadas através da razão massa carga (m/z) dos íons protonado $[M+H]^+$ e o aduto de sódio $[M+Na]^+$. As surfactinas pertencem à primeira família e foram identificadas através dos íons de m/z 1008,6597, 1072,6870 e 1016,6248, as quais são a C-13, C-16 e C-13, respectivamente. As duas iturinas pertencem à segunda família são a C-14 e C-15, com os íons de m/z 1066,6368 e 1080,6518, respectivamente. A Tabela 8 também apresenta os biossurfactantes produzidos por *B. methylotrophicus* nas mesmas condições de incubação, com os PAHs como fonte de carbono e energia. A análise mostrou os sinais dos íons de m/z 1016,6246 e 1022,6766, correspondendo a surfactina C-13 e C-14, respectivamente. Os espectros de massa da Q-TOF-MS destas análises estão disponíveis no Apêndice A (AAE-1 e AAE-2). Os resultados da análise por Q-TOF-MS demonstraram que o microrganismo analisado produz lipopeptídeos, como as surfactinas, bem como as iturinas. Esses resultados corroboram com a literatura como relatado por UZOIGWE *et al.*, (2015); LIAO *et al.*, (2016); GEISLER *et al.*, (2017); JEMIL *et al.*, (2017); MORO *et al.*, (2018); SARWAR *et al.*, (2018), que investigaram a composição de extratos de lipopeptídeos bacterianos.

Tabela 8. Composição dos lipopeptídeos produzidos por *B. methylotrophicus*.

Fonte de carbono	Estrutura	Fórmula molecular [M]	[M+H] ^{+(a)}	[M+Na] ^{+(b)}	Massa erro [ppm] ^(c)
HA	C-13 Surfactina	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008,6597	-	-0,6
	C-13 Surfactina	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	-	1016,6248	0,6
	C-16 Surfactina	C ₅₆ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1072,6870	-	3,2
	C-14 Iturina	C ₅₄ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	-	1066,6368	4,0
	C-15 Iturina	C ₅₅ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	-	1080,6518	4,5
PAHs	C-13 Surfactina	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	-	1016,6246	0,8
	C-15 Surfactina	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022,6766	-	-1,8

(a) e (b) Íons de m/z [X+Y]⁺ identificados.

(c) O termo "massa erro" é a exatidão de massa, definido como a diferença proporcional entre o valor teórico e o valor encontrado na análise, convencionalmente, é aceito um erro de até ± 5 ppm (BRENTON & GODFREY, 2010).

2.3.6.2 Glicolipídios produzidos por *Pseudomonas sihuiensis*

Os glicolipídios também foram identificados com o emprego da Q-TOF-MS no modo de ionização positiva. Uma molécula de ramnolipídeo é composta de duas partes principais, uma hidrofílica, consistindo de uma ou duas moléculas de ramnose e uma parte lipofílica, formada por cadeias de ácidos graxos saturados ou insaturados (PATOWARY *et al.*, 2018). Na Tabela 9 são apresentados os biosurfactantes glicolipídicos que foram identificados após 46 dias de incubação de *P. sihuiensis* em água do mar, tendo como única fonte de carbono e energia os hidrocarbonetos alifáticos. A análise revelou um total de 6 ramnolipídeos congêneres identificados nos sobrenadantes de cultura após a extração. Destes, um de íon m/z 821,5968 é uma molécula protonada de di-ramnolipídeo. O segundo íon (m/z 881,6106) corresponde a um aduto de potássio de di-ramnolipídeo e o terceiro íon (m/z 845,5221) é um aduto de sódio de di-ramnolipídeo. Os demais ramnolipídeos congêneres foram sintetizados quando os PAHs foram utilizados como fonte de carbono e energia durante a biodegradação. Estas três moléculas foram identificadas através dos íons de m/z 821,5869, 853,5763 e

997,6901, que corresponde aos adutos de potássio dos mono-ramnolipídeos e dois di-ramnolipídeos, respectivamente. Os espectros de massa da Q-TOF-MS correspondentes às moléculas de congêneres dos ramnolipídeos estão apresentados no Apêndice A (AAF-1 e AAF-2).

Tabela 9. Composição dos glicolipídios produzidos pela *P. sihuiensis*.

Fonte de carbono	Estrutura ^(a)	Fórmula molecular [M]	[M+H] ^{+(b)}	[M+K] ^{+(c)}	[M+Na] ^{+(d)}	Mass error [ppm] ^(e)
HA	Di-ram	C ₄₈ H ₉₀ O ₁₁	-	881,6106	-	1,0
	Di-ram	C ₄₄ H ₈₄ O ₁₃	821,5968	-	-	2,1
	Di-ram	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₅	-	-	845,5221	1.4
PAHs	Mono-ram	C ₄₆ H ₈₆ O ₉	-	821,5869	-	4,1
	Di-ram	C ₄₆ H ₈₆ O ₁₁	-	853,5763	-	4,6
	Di-ram	C ₅₄ H ₁₀₂ O ₁₃	-	997,6901	-	5,0

(a) Di-ram: di-ramnolipídeo e Mono-ram: mono-ramnolipídeo.

(b), (c) e (d) Íons de m/z $[X+Y]^+$ identificados.

(e) O termo "massa erro" é a exatidão de massa, definido como a diferença proporcional entre o valor teórico e o valor encontrado na análise, convencionalmente, é aceito um erro de até ± 5 ppm (BRENTON & GODFREY, 2010).

Os biossurfactantes são compostos anfífilicos com porções hidrofílicas e hidrofóbicas e as suas composições químicas contribuem com finalidades específicas na natureza e aplicações biotecnológicas (GEETHA *et al.*, 2018). Os biossurfactantes de baixo peso molecular como lipopeptídeos (por exemplo, surfactina e iturina), assim como glicolipídeos: ramnolipídeos, reduzem a tensão superficial e interfacial entre diferentes fases (líquido-líquido, líquido-ar e líquido-sólido), necessitando de baixa concentração micelar crítica (CMC) (SOUZA *et al.*, 2017) e estão envolvidos na solubilização (biodisponibilidade) de substratos apolares (isto é, hidrocarbonetos de petróleo hidrofóbicos). Com estas características, os biossurfactantes proporcionam aumento na taxa de biodegradação (UZOIGWE *et al.*, 2015; GEETHA *et al.*, 2018). Os biossurfactantes produzidos pelo *Ancyllobacter polymorphus* não foram identificados pela análise de Q-TOF-

MS, necessitando de outras técnicas de identificação para elucidar que biossurfactantes são estes.

2.3.7 Determinação da tensão superficial, índice de emulsificação e pH

O sucesso da biodegradação de poluentes orgânicos no meio ambiente depende do potencial genético microbiano, da biodisponibilidade dos contaminantes e da estrutura do contaminante recalcitrante. Assim, para estabelecer e manter altas taxas de biodegradação em áreas contaminadas, é importante a presença de condições ambientais favoráveis (MAIER & GENTRY, 2015). A Tabela 10 apresenta os resultados relacionados a determinação da tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE_{24h}(%)) e pH dos sobrenadantes livre de células no quadragésimo sexto dia de cultivo, obtidos da biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs. Os resultados da TS e IE_{24h}(%) mostram que os isolados bacterianos foram capazes de produzir biossurfactantes e emulsificantes em água do mar durante a biodegradação, com exceção do *A. polymorphus*, que não demonstrou capacidade emulsificante. A redução da medida da tensão superficial mais evidente foi obtida por *P. sihuiensis*, que alcançou 47,9 e 60,4 mN/m durante a biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs, respectivamente, com diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos resultados do *B. methylotrophicus* e condição de controle. *P. sihuiensis* apresentou uma atividade emulsificante de 37,0 e 11,8 %, quando exposto a hidrocarbonetos alifáticos e PAHs, respectivamente. A atividade emulsificante do *B. methylotrophicus* foi inferior, de apenas 19,7 e 7,7 %, quando comparado a *P. sihuiensis*.

No entanto, *B. methylotrophicus* não foi capaz de reduzir a tensão superficial da água do mar durante a biodegradação dos PAHs em relação ao controle. SOUZA e colaboradores

(2012) identificaram isolados microbianos que emulsionam eficientemente diferentes hidrocarbonetos, como diesel, querosene e óleo de motor, sem e/ou nenhuma redução significativa na tensão superficial de seus meios de cultura, corroborando com MORO *et al.*, (2018). Este fenômeno também é relatado por MONTEIRO *et al.*, (2010); UZOIGWE *et al.*, (2015), onde citam que bioemulsificantes podem emulsionar dois líquidos imiscíveis, sem o efeito direto na redução da tensão superficial, mas possibilitam o aumento na área de contato, biodisponibilizando o substrato para o microrganismo (MONTEIRO *et al.*, 2010; UZOIGWE *et al.*, 2015).

O pH do meio é um fator limitante, na medida que influencia a diversidade, atividade e metabolismo microbiano, controlando atividades enzimáticas, processos de transporte e solubilidade de nutrientes (KOOLIVAND *et al.*, 2017). Como demonstrado na Tabela 10, os valores de pH do meio apresentaram uma pequena redução durante a biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos por todos os isolados microbianos. No entanto, apenas a redução do pH com *A. polymorphus* foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparada à condição controle. Os demais sobrenadantes não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao controle. A redução do pH durante a biodegradação de hidrocarbonetos pode ser atribuída à formação de ácidos orgânicos (também conhecidos como metabólitos intermediários) que pode ocorrer durante o processo de biodegradação (VERMA *et al.*, 2006). Além disso, *B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e *A. polymorphus* não apresentaram redução significativa ($p > 0,05$) nos valores de pH, quando comparados com a condição controle, durante a biodegradação dos PAHs. Isso foi, possivelmente devido ao efeito de tamponamento eficaz, resultado das concentrações naturais de íons de bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}) na água do mar. Quando as concentrações de ácidos orgânicos aumentam, ocorre a protonação destes, por íons HCO_3^- e CO_3^{2-} e, conseqüentemente, a

redução da concentração dos ácidos (VERMA *et al.*, 2006; TEIR *et al.*, 2007; EGGLESTON *et al.*, 2010). Em geral, a capacidade de tamponamento da água do mar atinge um mínimo de $\text{pH} \approx 7,5$. A capacidade de tamponamento reflete a capacidade do sistema marinho de resistir a mudanças no pH (JURY *et al.*, 2013; CAI *et al.*, 2017). Este fenômeno explica a redução não significativa do pH dos meios de cultura, durante os testes de biodegradação.

Tabela 10. Resultados da tensão superficial, índice de emulsificação e pH do inóculo livre de células bacterianas no quadragésimo sexto dia de cultivo.

Microorganismo	Tensão Superficial (mN/m)		Índice de Emulsificação (%)		pH	
	HA†	PAH‡	HA	PAH	HA	PAH
<i>B. methylotrophicus</i>	60,9 ± 1,1 ^b	65,3 ± 0,9 ^{a,b,c}	19,7 ± 2,1	7,7 ± 0,4	8,04 ± 0,06 ^b	8,07 ± 0,05 ^a
<i>P. sihuiensis</i>	47,9 ± 1,1 ^c	60,4 ± 0,8 ^b	37,0 ± 1,5	11,8 ± 1,4	7,88 ± 0,10 ^{a,c}	8,10 ± 0,01 ^a
<i>A. polymorphus</i>	53,3 ± 0,9 ^c	61,2 ± 0,6 ^c	NE*	NE*	7,76 ± 0,04 ^c	8,05 ± 0,04 ^a
Controle (água do mar)	66,3 ± 0,8 ^a		NE*		8,11 ± 0,02 ^{a,b}	

- Os resultados são mostrados como a média ± SD de três repetições biológicas. Os valores na mesma coluna, seguidos pela mesma letra, não diferiram significativamente para $p > 0,05$, obtidos com a análise por ANOVA unidirecional seguida pela multicomparação de Tukey.

† Hidrocarbonetos alifáticos

‡ Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

* NE: não emulsionou.

2.3.8 Determinação da eficiência dos microrganismos na biodegradação dos contaminantes em água do mar

2.3.8.1 Biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos

Os hidrocarbonetos utilizados neste estudo são uma mistura complexa, composta por uma ampla gama de alifáticos saturados de C8 a C33. Estes alifáticos foram extraídos do petróleo Bazu e utilizados como fonte de carbono e energia no teste de biodegradação em água do mar. A Figura 13 apresenta os resultados em percentagem de biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos que foram analisados por GC-FID e refletem a capacidade de biodegradação das bactérias *B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e *A. polymorphus*. Estas bactérias foram capazes de biodegradar preferencialmente os alcanos de cadeia média (C8 a C18), na faixa de (35,4 a 91,0 %), (41,6 a 94,0 %) e (29,2 a 91,1 %), respectivamente. Para os alcanos de cadeia longa (C19 a C33), o percentual de degradação foi na faixa de (20,7 a 50,2%), (21,2 a 48,0%) e (12,9 a 29,0%), respectivamente. Estas percentagens de biodegradação foram significativas ($p < 0,05$), quando comparadas aos controles. No mesmo ensaio, apenas *B. methylotrophicus* foi capaz de biodegradar o pristano (31,1 %), um isoprenóide mais recalcitrante dentre os hidrocarbonetos alifáticos estudados. Os percentuais de degradação do fitano, não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) em relação ao controle. Estes resultados são semelhantes aos encontrados na literatura para a biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos em condições salinas (KUNIHIRO *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2009; DELLAGNEZZE *et al.*, 2014; DENG *et al.*, 2014; SHEPPARD *et al.*, 2014).

A biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo pode ser prevista a partir da sua composição e segue uma ordem preferencial decrescente: alcanos lineares não ramificados > alcanos de cadeia linear ramificada > alcenos de cadeia ramificada > monoaromáticos > cicloalcanos > poliaromáticos > asfaltenos (MOHAMED *et al.*, 2006; TOLEDO *et al.*, 2006; VERMA *et al.*, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2011). No caso específico dos alifáticos, a biodegradação se inicia pela captura do substrato pelo microrganismo, seguida do metabolismo. A biodisponibilidade dos contaminantes é determinada pela sua solubilidade em água. Por exemplo, a solubilidade de C10 (0,052 mg/L) é 8,7 vezes maior que a do C18 (0,006 mg/L) (MAIER & GENTRY, 2015), o que propicia uma biodegradação maior do C10 em comparação com o C18.

Portanto, a maior porcentagem de biodegradação alifática ocorreu com alcanos de cadeia de tamanho médio (C8 a C18), como demonstrado nos resultados apresentados da Figura 13. Na mesma figura, é possível constatar que a biodegradação dos alifáticos de cadeia longa (C19 a C33) não foi tão eficiente, devido à baixa biodisponibilidade destes alcanos. Por outro lado, as menores taxas de biodegradação foram observadas com os isoprenóides (pristano e fitano), isto foi devido as suas estruturas químicas moleculares, uma vez que os alcanos ramificados são mais recalcitrantes à biodegradação, quando comparados aos alcanos de cadeia linear não ramificados, como relado por ROCHA *et al.*, (2011) e MAIER & GENTRY (2015). Tal resistência é atribuída pela posição, tamanho e estereoquímica das ramificações (CANTWELL *et al.*, 1978; SCHAEFFER *et al.*, 1979; MAIER & GENTRY, 2015). Em geral, os isoprenóides são mais resistentes à biodegradação quando as ramificações estão localizadas próximos e/ou na extremidade das moléculas, uma vez que a biodegradação geralmente se inicia pela oxidação terminal (SILVA *et al.*, 2007). A presença de ramificação (*efeito estérico*) ou de um grupo funcional acceptor de elétrons

(efeito eletrônico) dificulta o contato do substrato com o sítio ativo da enzima, alterando e/ou impedindo a reação química (*biotransformação*) (MAIER & GENTRY, 2015).

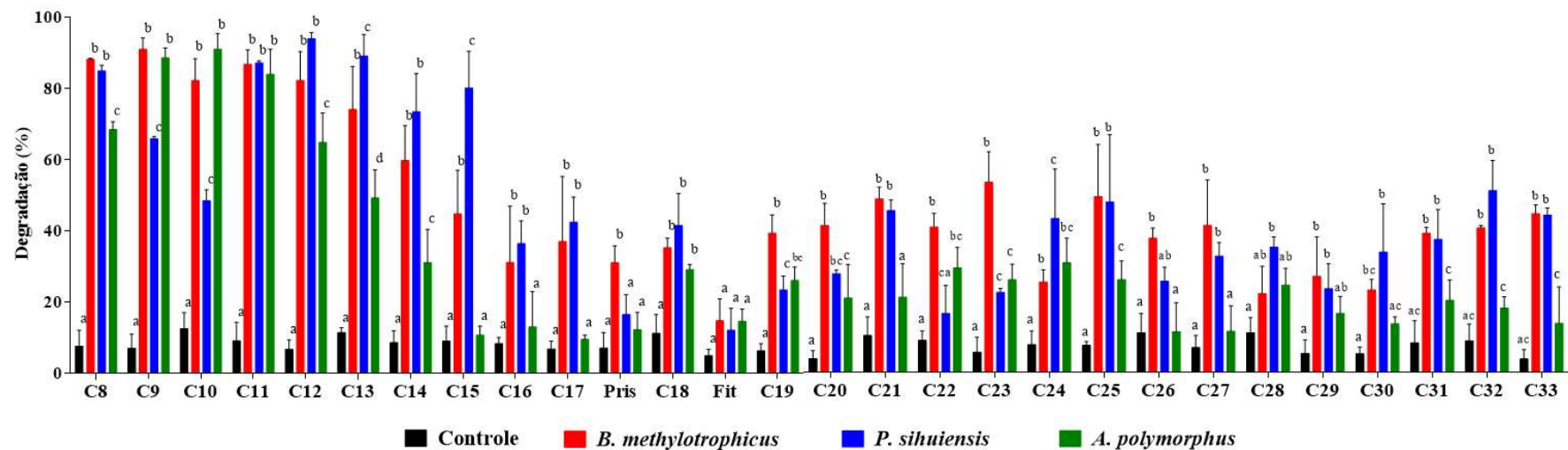


Figura 13. Porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos com 0,1 % (m/v) após 46 dias de incubação em água do mar a 30 °C e 200 rpm. Os hidrocarbonetos alifáticos (C8 a C33) não ramificados e os ramificados pristano (Pris) e fitano (Fit). Os resultados são apresentados como a média \pm SD de triplicatas biológicas. Cada grupo de barras, seguido pela mesma letra não difere significativamente ($p > 0,05$). Obtidos com a análise por ANOVA unidirecional seguida pela multicomparação de Tukey.

2.3.8.2 Biodegradação dos PAHs

Para obter uma melhor compreensão da capacidade metabólica de *B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e do *A. polymorphus* em água do mar, estes foram submetidos a uma mistura (equivalente) de naftaleno, antraceno, fenantreno e pireno, totalizando 0,1 % (m/v). Os testes de biodegradação foram realizados nas mesmas condições que foram submetidos os hidrocarbonetos alifáticos.

Na Figura 14 estão apresentados os percentuais de biodegradação destes PAHs por *B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e *A. polymorphus*. O percentual de biodegradação do antraceno foi de 45,1, 46,8 e 46,1 %, respectivamente, mas não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles. Os isolados *B. methylotrophicus* e *P. sihuiensis* biodegradaram o fenantreno 35,9 e 32,5 %, respectivamente, mas também estes resultados não foram significativos ($p > 0,05$), entre estes dois isolados, mas superiores e significativo ($p < 0,05$), quando comparados com o percentual de biodegradação do fenantreno 17,1 %. Entretanto, este percentual não foi significativo ($p > 0,05$), em relação à condição controle.

B. methylotrophicus e *P. sihuiensis* metabolizaram o pireno em 31,8 e 38,1 % sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles. Estes resultados foram significativos em relação ao percentual de biodegradação do pireno (13,5 %) por *A. polymorphus*. Como na situação do fenantreno, o percentual de biodegradação do pireno por *A. polymorphus* foi de apenas 13,6 %, não apresentando diferença estatística em relação à condição controle. Para resultados mais significativos de biodegradação dos PAHs nestas condições, seria necessário um tempo maior de incubação.

A explicação para os percentuais de biodegradação elevados do naftaleno (85 %) em média para os três isolados e do controle, 94,4 %, está no fato de que o percentual de

recuperação do naftaleno foi de apenas 5,8 % de naftaleno no teste de recuperação, devido a perdas por evaporação durante o período de incubação e no preparo da amostra para a quantificação por CG (Apêndice A Figura AAG-2). Entre os PAHs avaliados, o naftaleno apresenta a maior pressão de vapor ($8,5 \times 10^{-2}$ mmHg a 25 °C), quando comparado aos demais PAHs, com valores de $1,2 \times 10^{-4}$, $6,53 \times 10^{-6}$ e $4,5 \times 10^{-6}$ mmHg, 25 °C, para fenantreno, antraceno e pireno, respectivamente (FERREIRA *et al.*, 2012; BISHT *et al.*, 2015).

Segundo BISHT *et al.*, (2015) e MAIER & GENTRY (2015), os PAHs são classificados em duas categorias: (i) os PAHs de baixo peso molecular (2 ou 3 anéis), que são relativamente voláteis, solúveis e mais suscetíveis à biodegradação e (ii) os PAHs de elevado peso molecular (4 ou mais anéis) que possuem solubilidade aquosa limitada. Para os PAHs avaliados neste trabalho, a solubilidade em meio aquoso dos compostos antraceno, pireno, fenantreno e naftaleno é de 0,076, 0,132, 1,20 e 31 mg/L, respectivamente. Segundo MOLINA *et al.*, (2009); VITTE *et al.*, (2011), as propriedades químicas das moléculas dos PAHs, como o número de anéis aromáticos, geometria molecular ou do padrão de ligação do anel, influenciam no aumento da hidrofobicidade da molécula. Essas propriedades são fatores que contribuem para a persistência dos PAHs no meio ambiente e, portanto, tem uma tendência de recalcitrância, inversa em relação as taxas de biodegradação, por serem mais difíceis de serem metabolizados (KANALY & HARAYAMA, 2000).

Os testes de recuperação demonstram o adequado preparo das amostras durante as etapas de extração dos contaminantes dos inóculos, purificação e concentração destes para serem submetidos a análise quantitativa por CG-FID, alcançando resultados de recuperação para os hidrocarbonetos alifáticos na faixa de 80,5 a 96,8 % e para os PAHs na faixa de 83,2 a 95,8 % (Apêndice A Figuras AAG-1 e AAG-2), sendo considerados satisfatórios, segundo

a literatura (HERZFELDER & GOLLEDGE 2004; FERREIRA *et al.*, 2012; KDHE, 2015; BELO *et al.*, 2017).

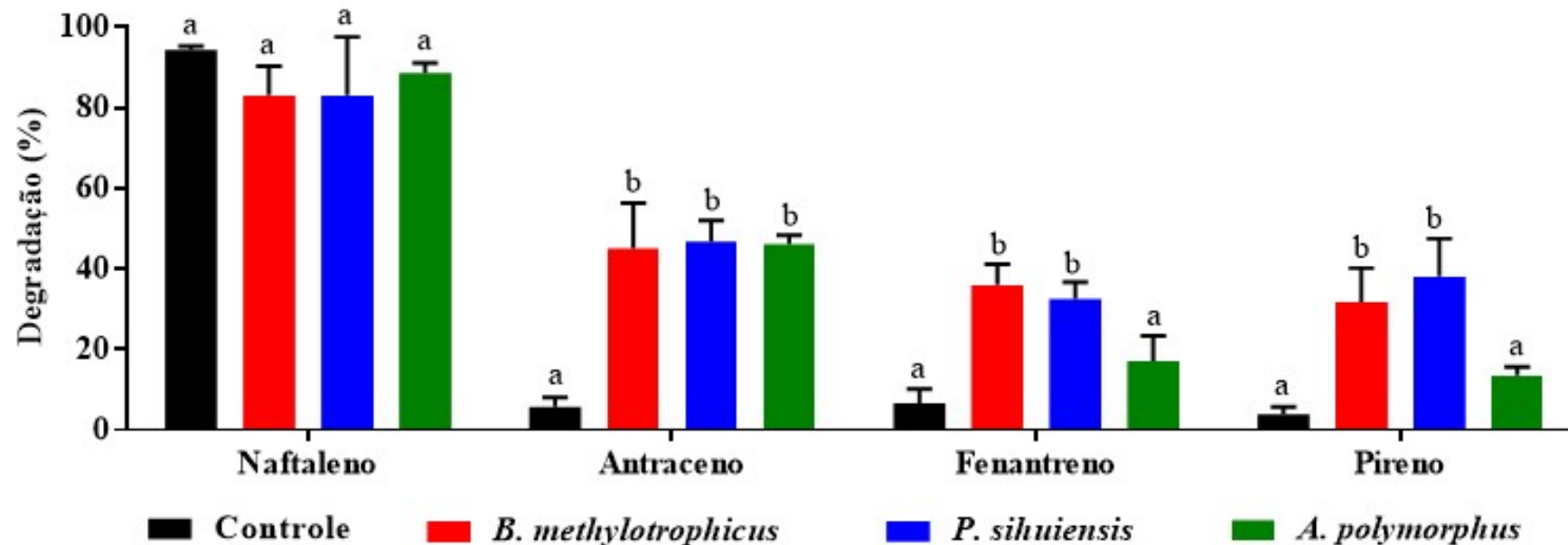


Figura 14. Porcentagem de degradação em água do mar contaminada com uma mistura (equivalente) de naftaleno, antraceno, fenantreno e pireno, totalizando 0,1 % (m/v), após 46 dias de incubação a 30 °C e 200 rpm. As barras representam os percentuais de biodegradação: a primeira é a condição controle, a segunda *B. methylotrophicus*, a terceira *P. sihuiensis* e a quarta *A. polymorphus*. Os resultados são apresentados como a média \pm SD de três repetições biológicas. Cada grupo de barras, seguido pela mesma letra não difere significativamente ($p > 0,05$). Obtidos com a análise por ANOVA unidirecional seguida pela multicomparação de Tukey.

Os resultados percentuais de biodegradação apresentados neste trabalho sugerem que os microrganismos avaliados apresentam capacidade de metabolizar os hidrocarbonetos alifáticos e os PAHs como fonte de carbono e energia. Entretanto, os resultados em termos de percentuais de biodegradação das frações de hidrocarbonetos alifáticos, foram superiores, quando comparados com os dos PAHs, nas mesmas condições experimentais utilizando os mesmos microrganismos (*B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e *A. polymorphus*), corroborando com os resultados obtidos por JACQUES *et al.*, (2007); McFARLIN *et al.*, (2014); MAIER & GENTRY, (2015).

3. Capítulo II: Síntese de padrões internos para o desenvolvimento e validação de metodologia analítica por GC-FID para a determinação do teor de ésteres metílicos ou etílicos a partir de matérias-primas convencionais e não convencionais.

No Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foi realizado o delineamento, síntese e purificação dos padrões internos de interesse, com a participação da aluna de doutorado Amanda Pasinato Napp, sob a supervisão da Professora Marilene Henning Vainstein. Este trabalho contou com a colaboração de diferentes Laboratórios de Pesquisa.

As análises de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier e Termogravimétrica foram realizadas nos laboratórios de Química Industrial e Laboratório de Caracterizações de Materiais da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob a supervisão dos Professores Marcus Seferin, Jeane Ayres e Rosane Ligabue e colaboração do Dr. Leonardo Moreira dos Santos.

No Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foram realizadas as análises por cromatografia gasosa, com o auxílio da aluna de doutorado Amanda Pasinato Napp, sob a supervisão da Professora Luciane Maria Pereira Passaglia.

3.1 INTRODUÇÃO

A qualidade dos biodiesel produzidos após o processo de transesterificação e/ou esterificação independente das fontes de matérias-primas (gorduras de origem vegetal ou animal) e do álcool (metanol ou etanol) utilizadas, devem estar adequadas às especificações determinadas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) para que estes sejam comercializados em todo o território nacional (ATADASHI *et al.*, 2011; BERRIOS *et al.*, 2011; ANP, 2018; ODEN, 2018). A ANP utiliza como referência a Norma Europeia EN 14214, que relaciona todas as metodologias a serem aplicadas durante o controle de qualidade do biodiesel, determinando os requisitos e métodos de ensaio (EN 14214:2008). Entre estas está a determinação da pureza do biodiesel, expressa como o teor de ésteres graxos, cuja metodologia é descrita nas normas EN 14103, (2003 e 2011).

O método analítico descrito na EN14103 faz uso da cromatografia gasosa. No ensaio, os componentes da mistura são separados, ao serem arrastados por um gás inerte (fase móvel), ao longo de uma coluna capilar cuja parede interna é recoberta por um filme de natureza polar (fase estacionária). As diferentes propriedades dos componentes da mistura, como sua volatilidade, por exemplo, contribuem para que cada um percorra a coluna em diferentes tempos (GIARDINA & MCCURRY, 2016). A quantificação para determinar o teor de ésteres graxos no biodiesel é realizada através da aplicação do método de padronização interna, no qual uma substância é adicionada à amostra em concentração conhecida, usada como calibração. Para ser utilizada como padrão interno, a substância deve estar ausente na composição da amostra, ser quimicamente estável, possuir alta pureza e baixo custo. Além disso, deve ter estrutura e propriedades semelhantes às dos analitos de interesse, de forma a apresentar tempo de retenção e fator de resposta próximos aos deles.

Mais ainda, deve produzir um pico bem resolvido no cromatograma (IOFI, 2011; VISENTAINER *et al.*, 2014). O método de padronização interna é extremamente útil quando aplicado em cromatografia gasosa, pois tem a vantagem de ser menos sensível a variações instrumentais, como volume de injeção e temperatura da coluna (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2001; RIBANI *et al.*, 2004; VISENTAINER *et al.*, 2014; GIARDINA & MCCURRY, 2016).

A EN 14103:2003 foi elaborada para quantificar biodiesel metílicos que possuem ésteres de cadeias carbônicas predominantes na faixa entre o tetradecanoato de metila (C14:0) e o metil-*cis*-15-tetracosenoato (C24:1). O padrão interno indicado na norma é o heptadecanoato de metila (C17:0), visto que, ácidos graxos de número ímpar de carbono são pouco comuns em fontes graxas (MARQUES *et al.*, 2010). Entretanto, algumas gorduras de origem animal, como a gordura bovina e suína, apresentam o heptadecanoato de metila em sua composição, ainda que em pequena proporção. Se o procedimento da norma é aplicado a biodiesel destas matérias-primas, erros de até 7 % na determinação da pureza são observados (SCHOBER *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2008).

Em 2009 a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) estabeleceu uma norma NBR 15764, (2009), a qual utiliza o método de padronização externa, com a aplicação de duas curvas analíticas para a determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel. Para aqueles biodiesel que apresentam predominância de ésteres metílicos ou etílicos, com cadeia carbônica na faixa de C6:0 ao C14:0, o padrão externa a ser aplicado na construção da curva analítica é o dodecanoato de metila ou etila. Para os biodiesel com predominância de ésteres metílicos ou etílicos de cadeia carbônica na faixa do C14:0 até o C24:1, o padrão externo a ser aplicado na construção da curva analítica é o octadecanoato de metila ou etila. Este método é suscetível a erros sistemáticos, como no preparo das amostras e dos padrões

externos, assim como, de injeção das soluções de padrões externos e das amostras, sendo necessário refazer as curvas analíticas periodicamente (RIBANI *et al.*, 2004; VISENTAINER *et al.*, 2014).

Na tentativa de substituir o C17:0 e estabelecer um composto químico de referência que possibilitasse a aplicação do método da padronização interna, mesmo para biodiesel derivados de gordura animal, e efetivar a sua aplicação, a EN 14103:2003 foi revista em 2011. Entre as modificações, foi ampliada a faixa de integração dos ésteres metílicos (C6:0 até o C24:1). O padrão interno passou a ser o nonadecanoato de metila (C19:0) para a determinação do teor de ésteres graxos metílicos. Entretanto, torna-se difícil o estabelecimento de condições cromatográficas que leve à resolução do seu pico aos produzidos pelo linoleato de metila (C18:2) e linolenato de metila (C18:3) (NBR 15764:2009; BRAUN *et al.*, 2017; FORFANG *et al.*, 2017; DA CRUZ *et al.*, 2018; ODEN, 2018).

Também, a necessidade de se encontrar outras fontes de matérias-primas assim como os óleos de amendoim, girassol e soja (fonte convencional), para a produção de biodiesel, devido ao aumento do custo destas matérias-primas comestíveis e o debate público sobre a questão “alimentos *versus* combustíveis” estimularam o desenvolvimento do chamado biodiesel de “segunda geração” a partir de óleos vegetais não comestíveis, como jatrofa, jojoba, resíduos do óleo de cozinha e gorduras de animais. No entanto, esses óleos podem não ser suficientemente abundantes para atender às necessidades da demanda de biodiesel globais, e as gorduras animais apresentam um desempenho ruim a baixa temperatura. O biodiesel de “terceira geração” está em desenvolvimento ao utilizar os chamados microrganismos oleaginosos como microalgas, leveduras, fungos filamentosos e algumas

bactérias que acumulam lipídios ao converter substratos como dióxido de carbono, açúcares, ácidos orgânicos e outros (SITEPU *et al.*, 2014).

A comunidade científica tem testado os óleos extraídos de diferentes sementes e polpas de frutas (*Astrocaryum huaimi* Mat. *Terminalia catappa*, *Irvingia gabonensis*, *Glycine max*, *Persea americana*, *Tithonia diversifolia* e *Dacryodes edulis*), para a produção de biodiesel metílico e etílico, oferecendo fontes não convencionais para este biocombustível (ALEXANDRE *et al.*, 2015; ADEKUNLE *et al.*, 2016). No Brasil, a semente da Atemoia, um fruto híbrido da Cherimoya (*Annona cherimola*) e Maçã-de-açúcar (*Annona squamosa*), pode servir como alternativa de matéria-prima não convencional para a produção de biodiesel. As sementes desta fruta apresentam um conteúdo lipídico de 27,3 % de óleo, próximo ao de outras sementes, como da soja (CRUZ *et al.*, 2013). Entretanto, o perfil dos ésteres metílicos obtidos após a reação de transesterificação do óleo desta semente demonstra a presença do C17:0 e C19:0 (DA CRUZ *et al.*, 2018). Sendo assim, as normas EN 14103, (2003 e 2011) não poderiam ser aplicadas como metodologia para determinar a pureza deste biodiesel, pois estes métodos preconizam o método de padronização interno, logo a EN 14103 não atenderia um dos requisitos básicos de um bom padrão interno, que é estar ausente na amostra a ser analisada.

Outra fonte não convencional de matéria-prima para a produção de biodiesel, que tem gerado um crescente interesse, é a produção microbiana de lipídios pelos microrganismos oleaginosos devido à sua capacidade de acumular até 20 % (m/m) de lipídios em peso seco da célula. O perfil de ácidos graxos sintetizados por estes microrganismos é amplo e os ácidos heptanecanóico e/ou nonadecanóico estão presentes (SITEPU *et al.*, 2014; FORFANG *et al.*, 2017).

Pelo exposto, depreende-se que é necessário avaliar a aplicação de outros padrões internos adequados aos requisitos básicos para a determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel produzidos por fontes não convencionais por cromatografia gasosa.

3.2 OBJETIVOS

Sintetizar ésteres graxos a partir de álcool de cadeia longa com ácidos graxos de cadeia curta, economicamente viáveis para serem utilizados com padrões internos no desenvolvimento e validação de metodologia analítica por GC-FID, para determinar o teor de ésteres metílicos e/ou etílicos de biodiesel produzidos a partir de gordura animal.

3.2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar os padrões internos a partir de reagentes alternativos (hexadecanol e os ácidos etanóico, propanóico e butanóico);
- Avaliar a seletividade dos padrões internos de interesse para os biodiesel metílicos e etílicos de matérias-primas oleaginosas e de gordura animal;
- Determinar o percentual de pureza dos padrões sintetizados;
- Desenvolver e validar metodologias analíticas por cromatografia gasosa para a determinação da pureza de biodiesel derivados de fontes diversas empregando os novos padrões internos.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Síntese dos ésteres

Os ésteres de hexadecila foram preparados por reação do hexadecanol (Sigma-Aldrich, 99 %) com os ácidos etanoico (Sigma-Aldrich, ≥ 99 %), propanoico (Sigma-Aldrich, $\geq 99,5$ %) e butanoico (Aldrich, ≥ 99 %), com base nas metodologias descritas (TIETZE & EICHER 1989; CARDOSO *et al.*, 2008; AYDIN & AYDIN, 2012; DING *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013). Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram misturados 20 g (82,5 mmol) de hexadecanol, seguidos do ácido carboxílico em uma razão molar de 3:1 e 0,5 % (m/m) de H₂SO₄. A mistura foi levada a temperatura de refluxo por 1 h. Após resfriar, a mistura foi transferida para um funil de separação. A fase inferior foi descartada e a fase superior com o éster graxo foi purificada por cromatografia em coluna empacotada.

3.3.2 Caracterização dos ésteres de hexadecila

A análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Análise Termogravimétrica (TGA) foram realizadas nos laboratórios de Química Industrial e Laboratório de Caracterizações de Materiais, respectivamente, da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

3.3.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A FTIR foi realizada em um espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum One, equipado com célula de refletância total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe, no intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} . O volume de cada amostra dos padrões sob análise foi de 100 μL (10 mg/mL) em solvente heptano (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) (BENDINI *et al.*, 2007; MIRGHANI *et al.*, 2011; AYDIN & AYDIN, 2012) e todos os espectros foram normalizados.

3.3.4 Análise Termogravimétrica

A TGA foi realizada em um equipamento SDT, modelo Q600 da TA Instruments em atmosfera de nitrogênio a uma taxa de aquecimento de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, na faixa de 50 $^{\circ}\text{C}$ a 400 $^{\circ}\text{C}$. A massa de amostra para cada análise foi de 10 a 11 mg e se utilizou porta-amostra de alumina (BS-EN ISO 11358, 1997; BUZETZKI *et al.*, 2011; AYDIN & AYDIN, 2012). O padrão de referência foi o C17:0 (Fluka, $\geq 99\%$, Lote: BCBL1383V).

3.3.5 Teor de pureza dos ésteres

Cada amostra foi preparada pesando 50 mg do padrão em um balão volumétrico e foi avolumado a 5 mL com uma solução de C17:0 (10 mg/mL). A análise por cromatografia gasosa (GC) foi realizada em um cromatógrafo a gás Perkin Elmer Clarus 600, equipado com um detector por ionização em chama (FID) e um injetor automático, no laboratório do Núcleo de Microbiologia Agrícola (NMA) do Departamento de Genética da UFRGS. As amostras foram injetadas (1 μL) no modo split (30:1) a uma temperatura de 250 $^{\circ}\text{C}$, com o detector na mesma temperatura. O nitrogênio foi utilizado como gás carreador em vazão constante (1 mL/min). A separação cromatográfica foi realizada numa coluna capilar de

polietilenoglicol SUPELCOWAX10 (30 m x 0,20 mm x 0,20 μm). A temperatura do forno foi ajustada a 130 °C por 2 min e aumentou a uma taxa de 45 °C/min até 200 °C; foi então mantido a 200 °C por 0,5 min e novamente aumentou a uma taxa de 2,8 °C/min a 250 °C; finalmente foi mantido a 250 °C por 1 min. Os cromatogramas foram integrados na faixa que inclui os picos de C6:0 a C24:1. O teor de pureza de cada um dos padrões sintetizados foi determinado com base no C17:0 (Fluka, $\geq 99\%$) como padrão de referência, segundo a EN 14103 (2003 e 2011). Para cada padrão, 7 amostras foram preparadas e injetadas em triplicatas.

3.3.6 Teste de seletividade

Os biodiesel metílicos e etílicos de matérias-primas de oleaginosas (óleo de soja) e gorduras animais (gordura bovina) foram sintetizados e doados pelo Departamento de Engenharia de Processos da Fundação de Ciência e Tecnologia (CIENTEC). O teste de seletividade para estes biodiesel, com e sem os padrões internos de interesse (ésteres sintetizados) e de referência (C17:0 e C19:0), foram realizados, para identificar a sobreposição destes picos com alguns dos picos dos ésteres que fazem parte da composição química dos biodiesel. Para isto, foram realizadas três injeções das amostras consecutivas (ICH, 2005; USP, 2009). Cada amostra foi preparada pesando 50 mg de biodiesel em balão volumétrico e este, foi avolumado a 5 mL com uma solução dos padrões de interesse e de referência, o C17:0 e C19:0 (2 mg/mL), separadamente, com base em CUCU & MEULENAER (2015).

Os perfis cromatográficos dos biodiesel metílicos e etílicos de oleaginosas e gorduras animais foram definidos através da sobreposição dos picos dos ésteres metílicos de ácidos

graxos de uma mistura de 37 padrões (Supelco, F.A.M.E. Mix, C4-C24) de concentrações variadas (HEJAZI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2015). Através dos tempos de retenção dos picos dos padrões hexanoato de metila (C6:0) e o metil-*cis*-15-tetracosenoato (C24:1), que fazem parte da mistura, foi possível otimizar as condições operacionais cromatográficas para a realização dos testes de seletividade (ICH, 2005; USP, 2009; EN 14103:2011).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Isomeria de posição dos ésteres

Através da reação de esterificação de Fischer foi possível sintetizar os ésteres graxos a partir de álcool de cadeia longa com ácidos graxos de cadeia curta, como os ésteres etanoato de hexadecila (EHD), propanoato de hexadecila (PHD) e o butanoato de hexadecila (BHD) (Figura 15). A vantagem destes ésteres (padrões internos de interesse) em relação aos ésteres que são utilizados como padrões internos de referência (heptadecanoato de metila (HME) e nonadecanoato de metila (NDM)) pelas EN 14103:2003 e EN 14103:2011, é que eles não se encontram presentes após a síntese de biodiesel, independentemente do tipo de matéria-prima e/ou de álcool utilizado na produção deste biocombustível (SCHOBER *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2008; NBR 15764:2009).

A Figura 15 apresenta as estruturas químicas dos padrões de interesse sintetizados e dos padrões de referência. De acordo com VANNINI *et al.*, (2015) e XIA & BUDGE (2018), os isômeros de posição são aqueles que possuem a mesma fórmula molecular e função, mas diferem um do outro na localização dos grupos funcionais na cadeia de carbono. Desta forma, o EHD, PHD e o BHD são isômeros de posição do HME e o NDM, pois diferem apenas pela posição da função química éster na cadeia carbônica.

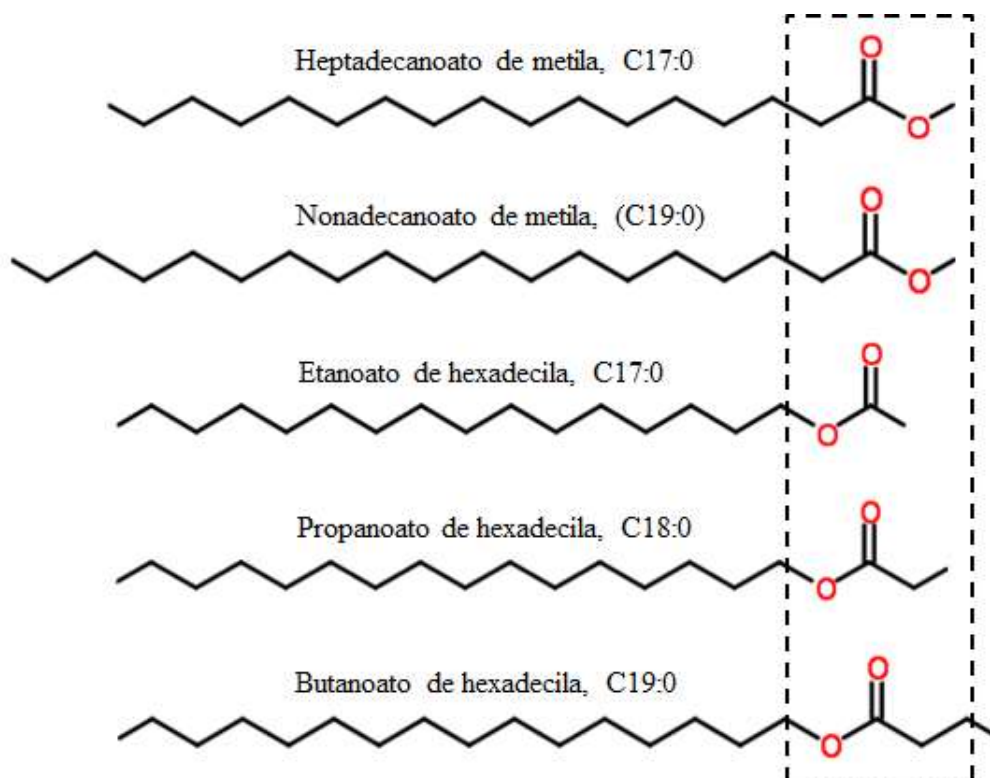


Figura 15. Estruturas químicas dos ésteres, e em destaque, o grupo éster. Os dois primeiros são os ésteres de referência: o heptadecanoato de metila (HME) e o nonadecanoato de metila (NDM). Os demais, são os ésteres de interesse: o etanoato de hexadecila (EHD), propanoato de hexadecila (PHD) e o butanoato de hexadecila (BHD).

Os isômeros de posição têm diferentes propriedades físicas, o que possibilita separar um composto do outro através de técnicas cromatográficas (SINANOGLOU *et al.*, 2013; YOSHINAGA *et al.*, 2014; VANNINI *et al.*, 2015; XIA & BUDGE, 2018).

3.4.2 Testes de seletividade dos ésteres

Na Figura 16 (A e B) estão demonstrados os perfis cromatográficos típicos dos principais ésteres metílicos e etílicos obtidos após a síntese do biodiesel de gordura bovina e identificados com base na literatura (SCHOBBER *et al.*, 2006; ISSARIYAKUL *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2008; NBR 15764:2009). Na Figura 16 A, estão sobrepostos os

cromatogramas do biodiesel metílico de gordura bovina, aos padrões internos de referência HME e NDM, assim como os padrões internos de interesse o PHD e BHD. Entre estes padrões, apenas o pico do PHD apresentou seletividade, com tempo de retenção (t_r) de 9,76 min. A seletividade alcançada se deve, principalmente, à otimização da temperatura do forno durante a análise. Nas mesmas condições de análise, os demais padrões co-eluíram com os ésteres que fazem parte da composição química do biodiesel de gordura bovina.

Na Figura 16 B, sob as mesmas condições de análise cromatográfica, o biodiesel etílico de gordura bovina foi analisado. O padrão interno BHD apresentou excelente seletividade com tempo de retenção de 10,80 min e o PHD não apresentou seletividade para o biodiesel etílico. Os demais padrões internos co-eluíram com os outros ésteres etílicos da amostra de biodiesel. Nesta amostra, cada um dos ésteres etílicos de ácidos graxos da gordura bovina possui um metileno adicional ($-\text{CH}_2$), que aumenta a massa molecular na cadeia carbônica. Isto influenciou na temperatura de ebulição de cada um dos ésteres etílicos, que, por consequência, permaneceram mais tempo na coluna capilar, aumentando os seus respectivos tempos de retenção, como previamente relatado na literatura (ISSARIYAKUL *et al.*, 2007; SKOOG *et al.*, 2007).

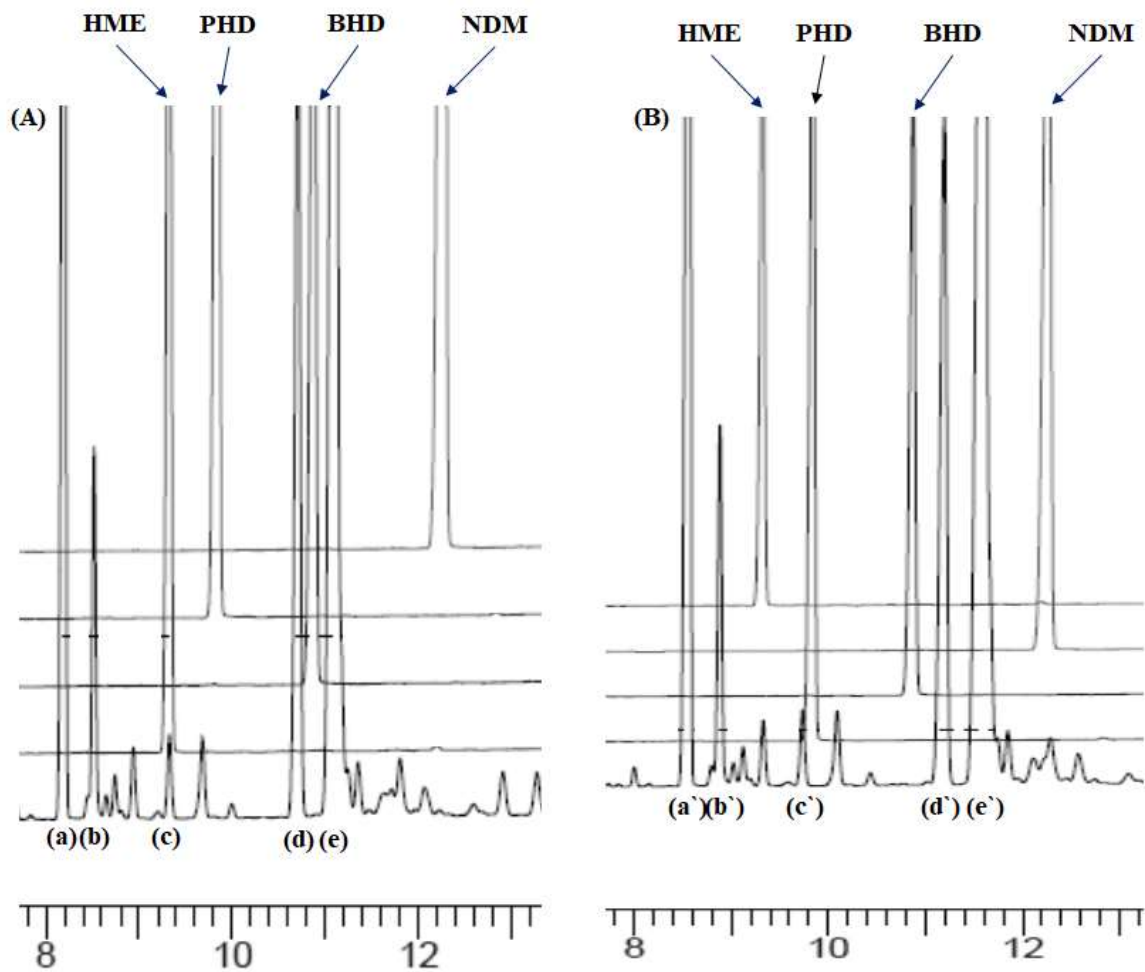


Figura 16. Perfis cromatográficos dos principais ésteres do biodiesel de gordura bovina (A e B), na faixa de tempo de retenção de 8 a 13 min. Ésteres: (a/a') palmitato de metila e etila, (b/b') palmitoleato de metila e etila, (c/c') heptadecanoato de metila e etila, (d/d') estearato de metila e etila e (e/e') oleato de metila e etila. Os padrões internos de referência (HME e NDM), padrões internos de interesse (PHD e BHD) e outros ésteres metílicos e etílicos.

O etanoato de hexadecila teve seu emprego avaliado em laboratório parceiro e os resultados encontram-se publicados (BRAUN *et al.*, 2017). O método foi desenvolvido e aplicado a biodiesel metílico e etílico de óleos de soja e canola. Para este padrão, os testes de seletividade, exatidão, repetitividade, precisão intermediária e robustez foram avaliados e considerados apropriados para o escopo de aplicação do método.

3.4.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier dos ésteres

As faixas de vibração de estiramento do grupo funcional carbonila (C=O) dos ésteres alifáticos, ocorrem nas regiões de 1750 a 1735 cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*, 2007; ROHMAN & MAN, 2010). Na Figura 17, o espectro no infravermelho característico do HME (Fluka, $\geq 99\%$), apresenta uma banda intensa em 1740 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo funcional carbonila (C=O) de éster alifático (SALIMON *et al.*, 2011). Na mesma figura, os ésteres EHD, PHD e o BHD, apresentaram a banda correspondente à vibração da carbonila na faixa de 1739 a 1743 cm^{-1} , corroborando com os resultados de AYDIN & AYDIN (2012), ao sintetizarem o mesmo tipo de ésteres de álcool de cadeia longa com um ácido graxo de cadeia curta.

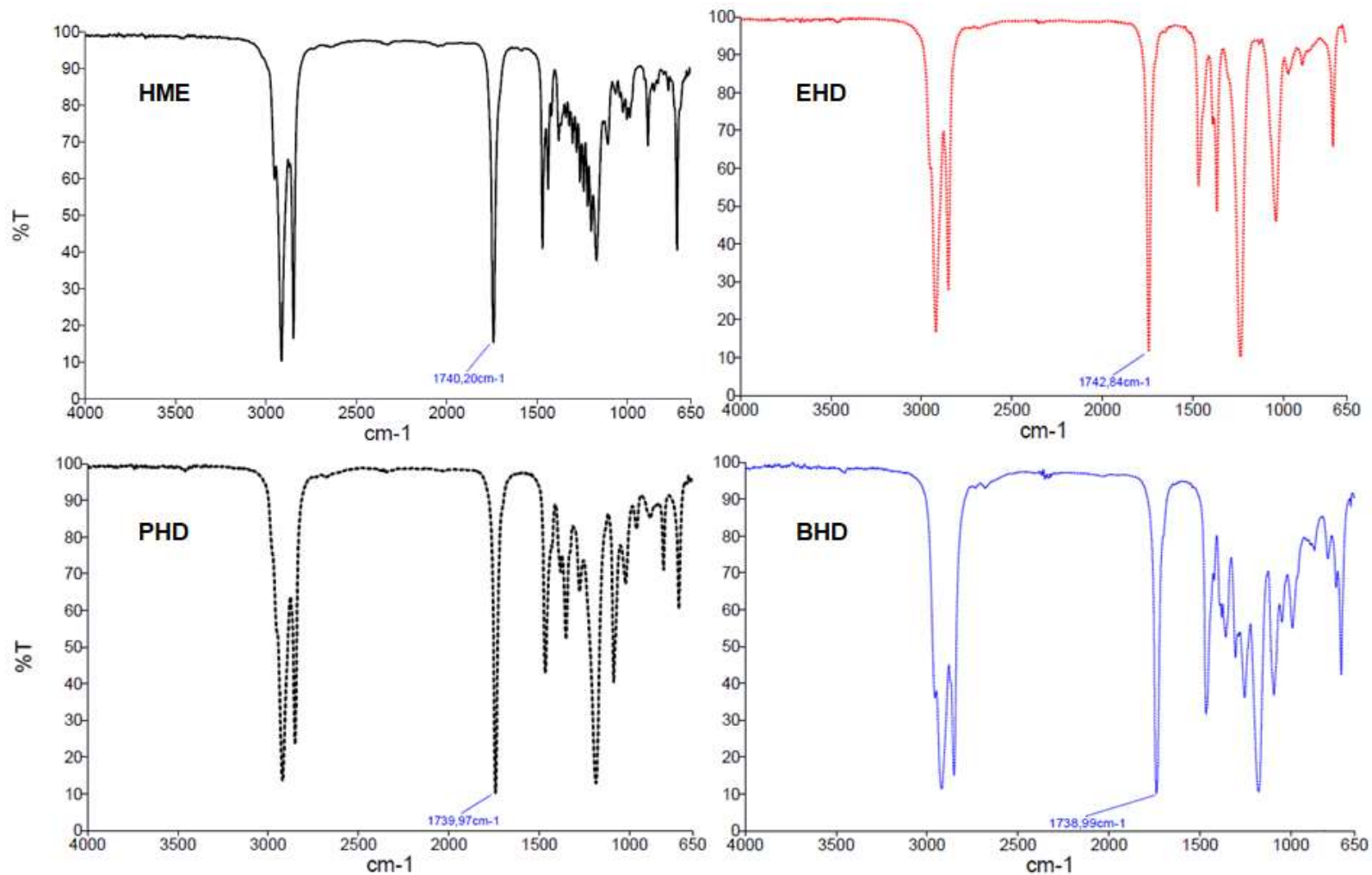


Figura 17. Espectros no infravermelho na região de número de onda de 4000 a 650 cm⁻¹. As bandas com a indicação numérica correspondem ao estiramento da carbonila (C=O) do grupo funcional éster alifático do padrão de referência, o heptadecanoato de metila (HME) e dos padrões internos de interesses, como o etanoato de hexadecila (EHD), propanoato de hexadecila (PHD) e o butanoato de hexadecila (BHD).

3.4.4 Análise termogravimétrica dos ésteres

A análise termogravimétrica é uma técnica, onde se pode acompanhar a perda de massa de uma amostra durante seu aquecimento. Na Figura 18 é demonstrado o perfil do comportamento térmico das quatro amostras (o padrão de referência HME e dos padrões de interesse EHD, PHD e BHD) submetidas a esta técnica. As amostras dos padrões de interesse tiveram comportamentos semelhantes ao demonstrado pelo HME (Fluka, $\geq 99\%$), sob as mesmas condições de análise, em que apresentaram uma única etapa de perda de massa entre 128,5 a 283,3 °C que se refere a decomposição dos ésteres, corroborando com os resultados de AYDIN & AYDIN (2012). Os percentuais de resíduos, também semelhantes, sugere que os padrões sintetizados têm elevado grau de pureza.

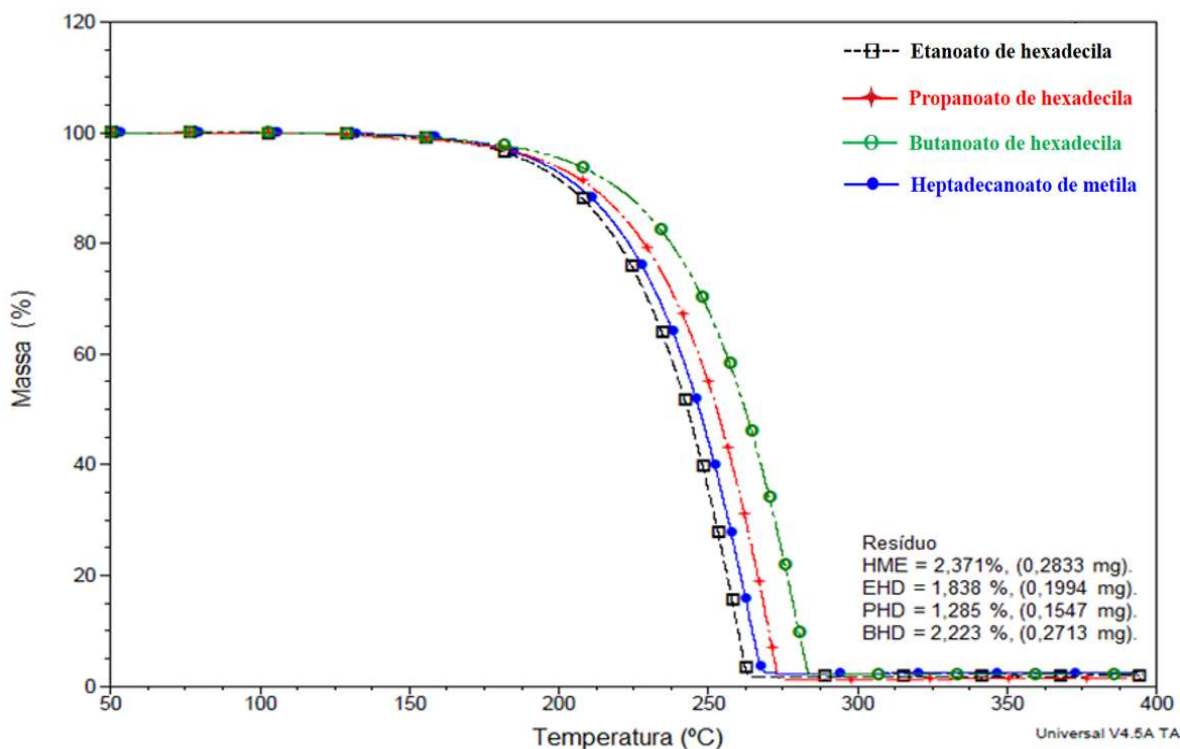


Figura 18. Curvas das análises termogravimétricas dos ésteres graxos demonstrando o comportamento de perda de massa com os seus respectivos resíduos. O heptadecanoato de metila (HME) é o padrão de referência e os demais padrões são os de interesse: o etanoato de hexadecila (EHD), propanoato de hexadecila (PHD) e o butanoato de hexadecila (BHD).

3.4.5 Teor de pureza dos ésteres

O teor de pureza dos ésteres graxos sintetizados foi determinado por GC-FID com base na EN 14103:2003, utilizando como padrão de referência o HME com pureza de 99,7 %, como demonstrado no certificado de análise deste padrão (Apêndice A, AAH). A Tabela 11 apresenta os resultados de pureza dos ésteres sintetizados EHD, PHD e BHD e do padrão de referência (HME). Os três ésteres têm elevado grau de pureza, superiores a 99 %. Entre as características de um bom padrão interno, o teor de pureza é um dos requisitos básicos para sua escolha, segundo CACHET *et al.*, (2011), e estes ésteres, neste requisito estão adequados.

Tabela 11. Teor de pureza dos ésteres graxos sintetizados.

Ésteres	Média (%)^(a)	RSD(%)
Etanoato de hexadecila	100,4 ± 1,3	1,2
Propanoato de hexadecila	100,0 ± 0,9	0,9
Butanoato de hexadecila	101,0 ± 1,2	1,1
Heptadecanoato de metila	99,7 ^(b)	-

(a) Média com intervalo de confiança de 95 % para 7 replicatas.

(b) O padrão interno heptadecanoato de metila definido pela EN 14103:2003, usado como referência, com pureza de 99,7 %. Material de referência certificado, Lote: BCBL1383V.

4. Capítulo III: Development and validation of analytical methodology by GC-FID using hexadecyl propanoate as an internal standard to determine the bovine tallow methyl esters content.

Este capítulo apresenta o artigo aceito em 14 de junho de 2018 e publicado no periódico *Journal of Chromatography B*, v. 1093–1094, p. 134–140 em 20 de junho de 2018 (EVANDRO PEREIRA *et al.*, 2018). Este trabalho contou com a colaboração de diferentes Laboratórios de Pesquisa.

O delineamento deste trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob a supervisão da Professora Marilene Henning Vainstein.

No Departamento de Engenharia de Processos da Fundação de Ciência e Tecnologia (CIENTEC), os biodiéseis utilizados neste trabalho foram sintetizados com a colaboração do aluno de graduação João Vitor Braun, sob a supervisão do Professor Luiz Antônio Mazzini Fontoura.

No Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foram realizadas as análises por cromatografia gasosa, com o auxílio da aluna de doutorado Amanda Pasinato Napp, sob a supervisão da Professora Luciane Maria Pereira Passaglia.

Os demais participantes deste trabalho foram citados no Capítulo II.

Além disso, este trabalho contou com o auxílio do Professor Luiz Antonio Mazzini Fontoura, que foi essencial para a análise dos dados e revisão do manuscrito.

Development and validation of analytical methodology by GC-FID using hexadecyl propanoate as an internal standard to determine the bovine tallow methyl esters content

Evandro Pereira^{a,*}, Amanda Napp^a, João V. Braun^b, Luiz A. M. Fontoura^b, Marcus Seferin^c, Jeane Ayres^{c,d}, Rosane Ligabue^c, Luciane M. P. Passaglia^e and Marilene H. Vainstein^{a,f}

^a*Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.*

^b*Department of Process Engineering, Fundação de Ciência e Tecnologia, Campus de Cachoeirinha, Av. das Indústrias, 2270, 94930-230 Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brazil.*

^c*School of Chemistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.*

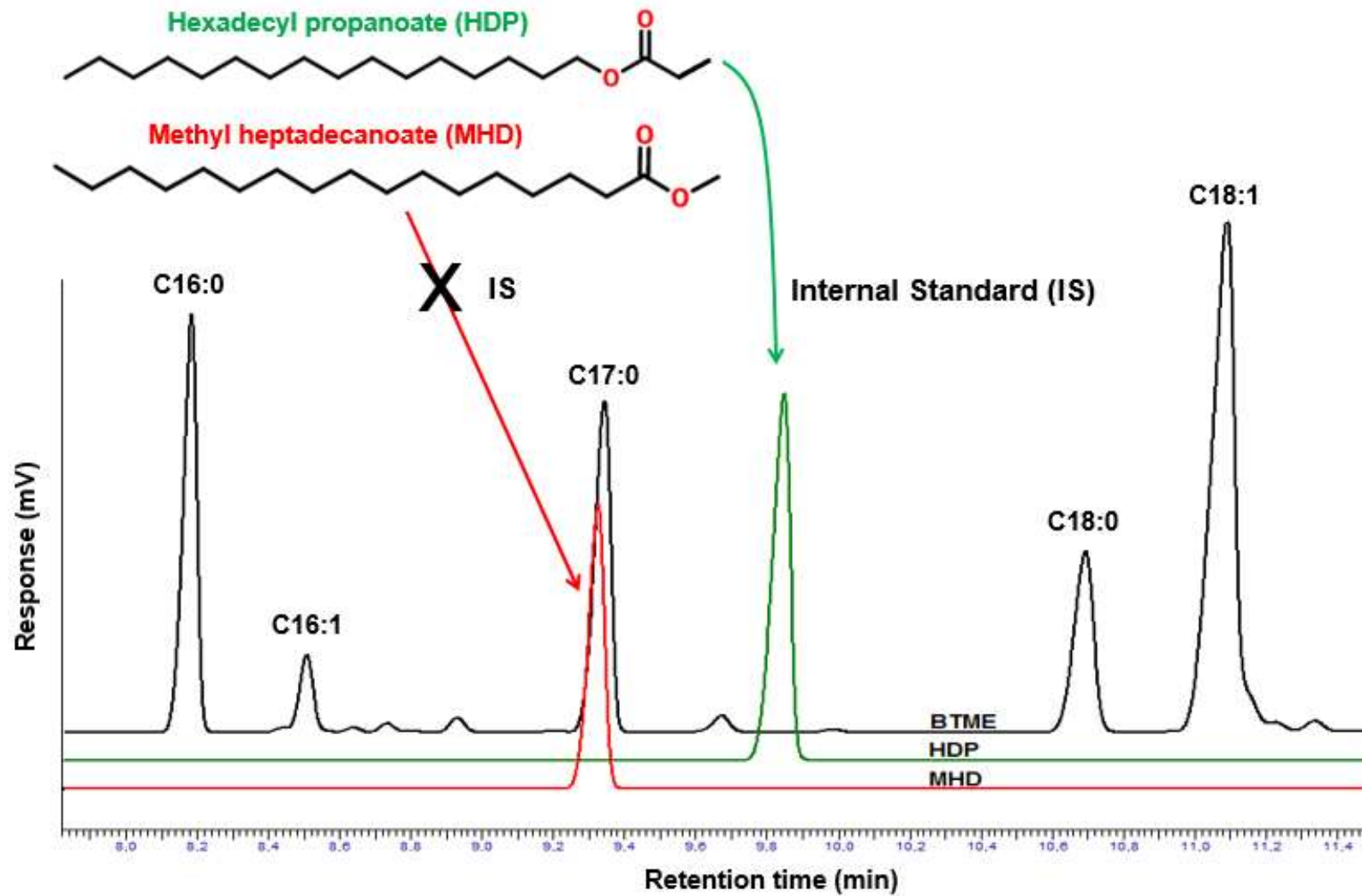
^d*Institute of Environment and Natural Resources, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.*

^e*Department of Genetics, Institute of Biosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 9500, CEP 91500-970, Porto Alegre, RS, Brazil.*

^f*Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 9500, CEP 91500-970, Porto Alegre, RS, Brazil.*

* Corresponding author. Tel.: +55 (51) 33086060; fax: +55 (51) 33087309 (Evandro Pereira). E-mail address: jespjbp@ig.com.br

Graphical abstract





Development and validation of analytical methodology by GC-FID using hexadecyl propanoate as an internal standard to determine the bovine tallow methyl esters content



Evandro Pereira^{a,*}, Amanda Napp^a, João V. Braun^b, Luiz A.M. Fontoura^b, Marcus Seferin^c, Jeane Ayres^{c,d}, Rosane Ligabue^c, Luciane M.P. Passaglia^e, Marilene H. Vainstein^{a,f}

^a Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Department of Process Engineering, Fundação de Ciência e Tecnologia, Campus de Cachoeirinha, Av. das Indústrias, 2270, 94930-230 Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brazil

^c School of Chemistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Institute of Environment and Natural Resources, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^e Department of Genetics, Institute of Biosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 9500, CEP 91500-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^f Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 9500, CEP 91500-970 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

GC-FID
Internal standard
Method validation
Bovine tallow methyl esters
Hexadecyl propanoate
Methyl heptadecanoate

ABSTRACT

EN 14103:2003 and EN 14103:2011 were developed in order to determine fatty acid methyl ester (FAME) content of biodiesel. The internal standards (IS) of biodiesel include methyl heptadecanoate (MHD) and methyl nonadecanoate (MND), respectively. However, since these ISs are also present in bovine tallow methyl esters (BTME) or overlapping peaks, they have not been efficient. This work proposes an improved BTME determination method by using hexadecyl propanoate (HDP) as an IS. For this purpose, an analytical methodology by Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) was developed and validated, where HDP demonstrated selectivity in retention time between peaks C16:1 and C18:0 for coconut and soybeans methyl esters and BTME, as well as resolution > 1.5 for the BTME in split mode 30:1. Trueness in the determination of BTME content using the HDP as an IS was statistically equivalent to confidence interval of 95% for the null hypothesis statistic test, even when only 20% of the HDP was utilized in comparison with the IS concentrations defined by EN 14103:2003 and EN 14103:2011. This allowed the biodiesel analysis to be performed five times more with 1 g of HDP. Furthermore, the method developed enabled us to reduce the analysis time by 21.6%, without prejudice to the integration of peaks (C6:0 to C24:1). Regarding the repeatability and intermediate precision tests, results of RSD (%) ≤ 2% were reached. Additionally, the method developed has proved to be robust. HDP is a long-chain fatty alcohol ester absent from feedstocks used in biodiesel synthesis. It presents all of the characteristics for a good IS, ideal for application via internal standardization method, as recommended by EN 14103.

1. Introduction

The main challenge of the 21st century is the paradigm of energy generation without environmental contamination. One viable solution to this problem is found in the use of biofuels obtained from renewable sources, such as biodiesel [1]. Biodiesel is defined as a fuel comprised of mono-alkyl esters of long-chain fatty acids derived from oils and fats [2]. It is produced worldwide by transesterification or esterification process of triglycerides with a low content of free fatty acids or a raw material rich in free fatty acids, respectively, with alcohol (methanol or ethanol) in the presence of a catalyst [3].

Biodiesel production was first described in 1937, where palm oil transesterification was performed by ethanol via an acid catalyst, in order to obtain ethyl esters [4]. Currently, biodiesel can either totally or partially replace diesel fuel in diesel engines, without requiring any motor modification [5,6]. However, commercial biodiesel must be in accordance with certain quality requirements. In Brazil, the National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP) has the responsibility to ensure the suitability of biofuels by establishing parameters and methods of analysis. Brazilian legislation (ANP 47/2014) lists all the standards and test methodologies that must be applied during the quality control of any biodiesel [7].

* Corresponding author.

E-mail address: jespbp@ig.com.br (E. Pereira).

Among these standards, the EN 14103:2003 is assessed through a gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) in order to determine fatty esters content in biodiesels obtained from oleaginous plants, ranging between C14:0 to C24:1 peaks. This methodology uses an internal standardization method, which applies MHD (C17:0) as internal standards (IS) and is not present in the oil composition [8]. However, heptadecanoic acid is present in some triglycerides feedstock, such as bovine tallow. The biodiesel derived from these sources cannot have their fatty esters content quantified by MHD as IS, since errors can get as high as 7% [9,10].

As a result, in 2009 the Brazilian Association of Technical Standards (ABNT) published the Brazilian Normative NBR 15764 [11] in an attempt to overcome the limitations of EN 14103:2003. It uses external standardization methods with the application of two calibration curves to determine the fatty esters content in biodiesel, regardless of the type of feedstock and alcohol [11]. However, this method is prone to errors in sample and external standards preparation, as well as in the injection of those solutions, so that it is necessary to remake the calibration curves periodically, resulting in an increase cost of final analysis [12,13]. Moreover, it uses the dichloromethane as a solvent, which when continuously exposed to the burning of chlorinated compounds in the flame detector, promotes the loss of sensitivity of the FID. The hydrochloric acid attacks the detector causing its corrosion, resulting in the detection of an electric signal generated by the detector and interfering directly with the results of chromatographic analysis [14].

In 2011, the EN 14103 was revised and methyl nonadecanoate (MND = C19:0) became the new IS to determine the fatty acid methyl ester (FAME) content. The standard revision also modified the chromatogram integration interval, including the range from methyl hexanoate (C6:0) to methyl cis-15-tetracosenoate (C24:1) esters peaks [15]. However, the MND peak is difficult to be resolved from methyl linoleate (C18:2) and methyl linolenate (C18:3) [16]. Another interference of this IS is the overlay with a peak of the natural MND obtained after the synthesis of BTME, as shown in NBR 15764 [11].

Canola, palm and soybean oils are the most world widely feedstock used in biodiesel production [17–21]. In Brazil, the main sources are soybean oil and bovine tallow, corresponding to 74.8 and 20.3% of production, respectively [22]; thus reinforcing the need for the improvement in the methodology of EN 14103 to determine fatty methyl or ethyl ester content of biodiesel from these sources. Therefore, it is necessary to evaluate the application of other fatty esters that are appropriate to the basic requirements of a good IS. A good IS must contain the following characteristics: (i) it should not be present in the sample; (ii) it should have similar physicochemical properties (particularly in functional group type, boiling point and polarity); (iii) it should not overlay with another sample component; (iv) it should have a high degree of purity; (v) it should be added in concentrations close to the analytes; (vi) it should have good stability [23].

The aim of this work was to develop and validate an analytical methodology by GC-FID, employing hexadecyl propanoate (HDP) as an internal standard, in order to determine fatty acid methyl ester content in biodiesel obtained from bovine tallow. The following analytical validation parameters were evaluated: selectivity, trueness, repeatability, intermediate precision, and robustness.

2. Material and methods

2.1. Standards and chemicals

The bovine tallow was donated by a butcher's shop in the city of Porto Alegre, Brazil. Coconut methyl esters (CCME) and soybeans methyl esters (SBME) were supplied by CIENTEC. Methyl hexanoate (C6:0 ≥ 99%) was purchased from Polysciences, Inc. Methyl fatty esters peaks were identified by their retention times obtained from a standard mix (Supelco, 18919-1AMP). Methyl heptadecanoate (MHD, Fluka, 99%), methyl nonadecanoate (MND, Fluka ≥ 98%) and heptane (99%)

were purchased from Sigma-Aldrich. Bovine tallow methyl esters were obtained through the transesterification double step process (TDSP) as described by Guzatto et al. [25]. Hexadecyl propanoate was synthesized from the Fisher synthesis [24] (HDP, 100 ± 0.9%, GC-FID).

2.2. Sample preparation

IS solutions were prepared by weighing 50 mg of MHD used as internal standard of reference (ISR) and HDP used as internal standard of interest (ISI), separately into 25 mL volumetric flasks which were filled up with heptane [26]. Biodiesel samples (50 mg) were weighed into 10 mL flasks and dissolved with 5 mL IS solution (MHD or HDP, as well as the MND). All the solutions were prepared based on EN 14103 (2003 and 2011) methods [8,15].

2.3. GC-FID analysis

The gas chromatography (GC) analysis was performed in a PerkinElmer Clarus 600 gas chromatograph, equipped with a flame ionization detector (FID) and auto-sampler Built-in. Sample aliquots were injected (1 µL) into the split mode (30:1) at a temperature of 250 °C, with the detector at the same temperature. Nitrogen was used as the carrier gas at constant flow (1 mL min⁻¹). Chromatographic separation was performed in a polyethylene glycol capillary column (SUPELLOWAX®10; 30 m, 0.20 mm i.d., 0.20 µm film thickness). The oven temperature was set at 130 °C for 2.0 min and increased at a rate of 45 °C min⁻¹ up to 200 °C; it was then kept at 200 °C for 0.5 min and increased at a rate of 2.8 °C min⁻¹ to 250 °C; finally it was kept at 250 °C for 1 min. Chromatograms were integrated in the range that includes the peaks of C6:0 to C24:1 [15].

In the *first set*, the mixtures of BTME and HDP were injected. The purity of BTME was expressed in percentage (wt%), obtained from ester content (C), determined according to EN 14103:2003 [8,9,17,42] calculated using Eq. (1):

$$C = \frac{(\sum A) - A_{ISI}}{A_{ISI}} \times \frac{C_{ISI} \times V_{ISI}}{w} \times 100 \quad (1)$$

where $\sum A$ is the total peak area from the methyl ester (C6:0 to C24:1); A_{ISI} is the peak area corresponding to ISI (HDP); C_{ISI} is the concentration of the HDP solution (mg mL⁻¹); V_{ISI} is the volume of the HDP solution (mL); and w is the weight of the BTME (mg).

In the *second set*, it is important to note that Eq. (1) must be modified when MHD is used as ISR, since it is naturally present in BTME [9]. Therefore, it is necessary to determine the specific area (SA) of C17:0 (Eq. (2)) present in natural BTME. $A_{C17:0 BTME}$ is the peak area of BTME C17:0 (blank); and C_{BTME} is the concentration of BTME solution (mg mL⁻¹). Thus, it is possible to obtain the corrected area of the ISR (CA_{ISR}) in Eq. (3). $A_{ISR} + A_{C17:0 BTME} = AA$ is the sum of the MHD peak area with the peak area of BTME C17:0; C_{ISR} is the concentration of MHD solution (mg mL⁻¹). Thereby, in Eq. (4), the V_{ISR} is the volume (mL) of C_{ISR} .

$$SA = \frac{A_{C17:0 BTME}}{C_{BTME}} \quad (2)$$

$$CA_{ISR} = \left[\left(\frac{AA}{C_{ISR}} \right) - SA \right] \times C_{ISR} \quad (3)$$

$$C = \frac{(\sum A) - CA_{ISR}}{CA_{ISR}} \times \frac{C_{ISR} \times V_{ISR}}{w} \times 100 \quad (4)$$

2.4. Validation of the method

The typical analytical characteristics used in the validation of this method (selectivity, resolution, trueness, repeatability, intermediate precision and robustness) were based on the guidelines: International

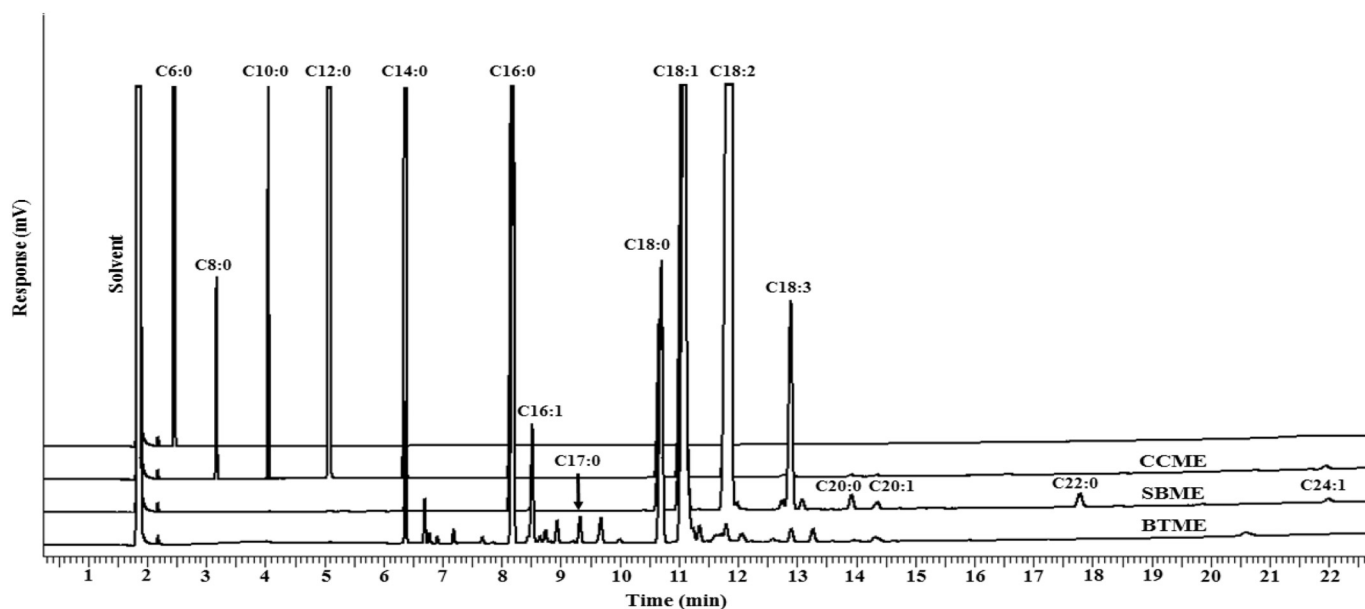


Fig. 1. Overlapping of the chromatographic profile between the BTME, SBME, CCME and C6:0 (methyl hexanoate), demonstrating the retention time from C6:0 to C24:1 for total of 22.91 min analysis.

Conference on Harmonization (ICH) [27,32] and United States Pharmacopeia (USP) [28].

2.4.1. Selectivity and resolution

To ensure the selectivity of the proposed method, three successive injections of BTME sample with and without IS addition (HDP, MHD and MND) were carried out [27,28,43]. To evaluate the peak resolution [27] of HDP, nine samples were consecutively injected in the split mode with 20:1, 30:1, and 50:1 split ratios. TotalChrom Basics® software, based on the USP [28] and American Society for Testing and Materials (ASTM) [40] was used to appraise parameters, which included the tailing factor (T_p) for assessing the asymmetry of peak, as well as the resolution (R_s) in relation to the IS peak of interest and its two adjacent ones.

2.4.2. Trueness of BTME purity

The BTME trueness was evaluated by method comparison. Seven independent solutions of biodiesel sample in HDP heptane solution were prepared [28–32] (*first set*). Each solution was injected in triplicate by the same analyst and instrument under the same conditions. Another set of seven replicates was prepared in MHD (EN 14103:2003) [8] heptane solutions, which was used as a reference method (*second set*). The comparison between the predictions of both methods was made by statistical analysis of variance (s^2) by the Fisher's test. The ester contents determined by the two different methods were compared by the Student t parameter [34,35,43].

2.4.3. Repeatability

Seven different sample solutions had their ester content determined by the same analyst and instrument conditions. Repeatability is expressed by the percent relative standard deviation (RSD (%)) [27–29,32,43].

2.4.4. Intermediate precision

Three sets of four sample solutions prepared by analyst A, B and C had their ester content determined. Each replicate was injected three times. Intermediate precision is expressed by the RSD (%) [27,28,43].

2.4.5. Robustness

Youden's test was applied in order to evaluate the robustness of

analytical methods in determination of BTME content. Whereby: (i) a study to determine the effect of small variations in analytical parameters was performed. Seven analytical parameters were selected (nominal value; capital letters) and compared with small variations (lower case letters) (Supporting Information Table S-1). A series of factorial combinations was applied generating eight chromatographic analyses and are demonstrated by letters from s to z (Supporting Information Table S-2). The effect of applying small variations in analytical parameters was expressed as the difference (D_i) between BTME contents, based on Eq. (5) [12,33,36,41,43].

$$Effect_{(X/x)} = \frac{ML}{4} - \frac{LCL}{4} = D_i \quad (5)$$

where $ML/4$ is the mean of the four values corresponding to capital letters (%) and $LCL/4$ is the mean of the four values corresponding to lower case letters (%) [41]. (ii) Eq. (6) defines the condition, with standard deviation of difference (SD_i) $\leq 2\%$ needed for the method to be robust [31,32]. Samples containing BTME (10 mg mL^{-1}) and HDP (2 mg mL^{-1}) [26] were injected in triplicates for each of combinations (Supporting Information Table S-2).

$$SD_i = \sqrt{2 \times \sum \left(\frac{D_i^2}{7} \right)} \quad (6)$$

Youden's test was applied to evaluate the robustness of the method [31,32]. Seven analytical parameters were selected: injector temperature, detector temperature, oven initial temperature, rate of heating (second ramp), flow rate, split mode and injected volume (Supporting Information Table S-1) [39]. A series of factorial combinations was applied in order to generate eight chromatographic analyses (Supporting Information Table S-2).

3. Results and discussions

3.1. Optimization of chromatographic analysis

Overlapping chromatographic profiles of the BTME, SBME and CCME are shown in Fig. 1. These esters were identified by their respective retention times (t_R), based on a mixture of 37 analytical standards of FAME [37], as well as analytical standard of methyl hexanoate (C6:0). For this, a GC isothermal program was applied at $130 \text{ }^\circ\text{C}$

for 2 min at the beginning of the chromatographic run, thus making it possible for the C6:0 peak (t_R : 2.47 min), to not co-elute with the solvent peak (heptane; t_R : 1.82 min), corroborating with Schober et al. [9] and Pardo et al. [10]. The temperature increase of 130 °C to 200 °C at a rate of 45 °C min⁻¹ and a 0.5 min isotherm, approximated the set of esters (C8:0 to C18:3) to the starting point of the chromatographic run with appropriate resolution between these peaks. Regarding this operation, the carrier gas flow (nitrogen, 1 mL min⁻¹), and rate of temperature increase (2.8 °C min⁻¹) of the chromatographic oven to 250 °C with a 1 min isotherm together ensured that the peak of the C24:1 (t_R : 21.98 min) was integrated, resulting in a total analysis time of 22.91 min. These chromatographic operating conditions reduced the analysis time by 26.1% when compared to the analysis time established by EN 14103:2011 (31 min) [15]. The chromatographic operating conditions set out in the development of this work for the analysis of BTME, SBME and CCME biodiesels did not impair the integration of peak areas of fatty esters from C6:0 to C24:1 as defined in EN 14103:2011 [15].

3.2. Selectivity and resolution of the HDP

Fig. 2 shows the overlapping of the chromatographic analysis of BTME (10 mg mL⁻¹) with the peaks of the MHD, HDP and MND IS, in concentrations of 2 mg mL⁻¹ [26]. The peak of MHD (t_R : 9.32 min) overlays with the natural peak (C17:0) of BTME due to the presence of heptadecanoic acid, which makes up part of the composition of bovine tallow triglycerides. This overlaying occurs when the heptadecanoic acid is methylated by the transesterification process for biodiesel synthesis and produces the same methyl heptadecanoate (C17:0 = MHD), which is used as an IS for EN 14103:2003 [8], as previously reported by Schober et al. [9] and Moraes et al. [10]. The

MND (t_R : 12.27 min) overlay with two small peaks (t_{RS} : 12.06 and 12.22 min) present in BTME chromatogram (Fig. 2) are most likely cause by linoleate isomers, as demonstrated by NBR 15764 [11]. The HDP peak (t_R : 9.89 min) is well resolved both from its left (L-HDP, t_R : 9.68 min) and right (R-HDP, t_R : 10.00 min) adjacent peaks. Resolutions at the baseline were estimated as 1.87 (L-HDP) and 1.51 (R-HDP) for the split mode 30:1, (Table 1) with the respective RSD (%) ≤ 2%, as defined in literature [27,28,42]. Resolutions > 1.5 are acceptable in such a complex sample and guarantee the complete peak separation. The resolutions of HDP in relation to its adjacent peaks were checked during the entire method validation process, as recommended by the literature [27,28] (Supporting Information Table S-3). Table 1 and the Supporting Information Table S-3 show the split mode 30:1, retention times, areas and height of the HDP peaks and their next two adjacent presented RSD (%) ≤ 2% [26,27]. An important aspect to notice is that the asymmetry (tail factor) of these three peaks is in the range of 0.77 up to 0.92 in compliance with literature [27,28].

The choice of HDP as an IS was made because of the fact that this is an ester from a long-chain alcohol with a short-chain fatty acid, and is therefore absent in any natural fatty feedstock [17–21]. In addition, HDP is a methyl stearate (C18:0) isomer, differing only by the carbonyl position [38]. This enables the flame ionization detector (FID) to produce an electrical signal with the same magnitude for the carbon atoms attached to hydrogens atoms (active carbon C*) [13,42,43] compared to the long-chain fatty esters, such as those that make up BTME. Furthermore, the HDP contemplates the characteristic requirements for an IS [13,23] used in the determination of ester content, as recommended by EN 14103:2003 [8] and EN 14103:2011 [15].

The results shown in this work as the selectivity of the HDP (Figs. 1 and 2) in relation to their retention time (9.89 min) for BTME allows us to deduct their application as internal standard to determine the SBME

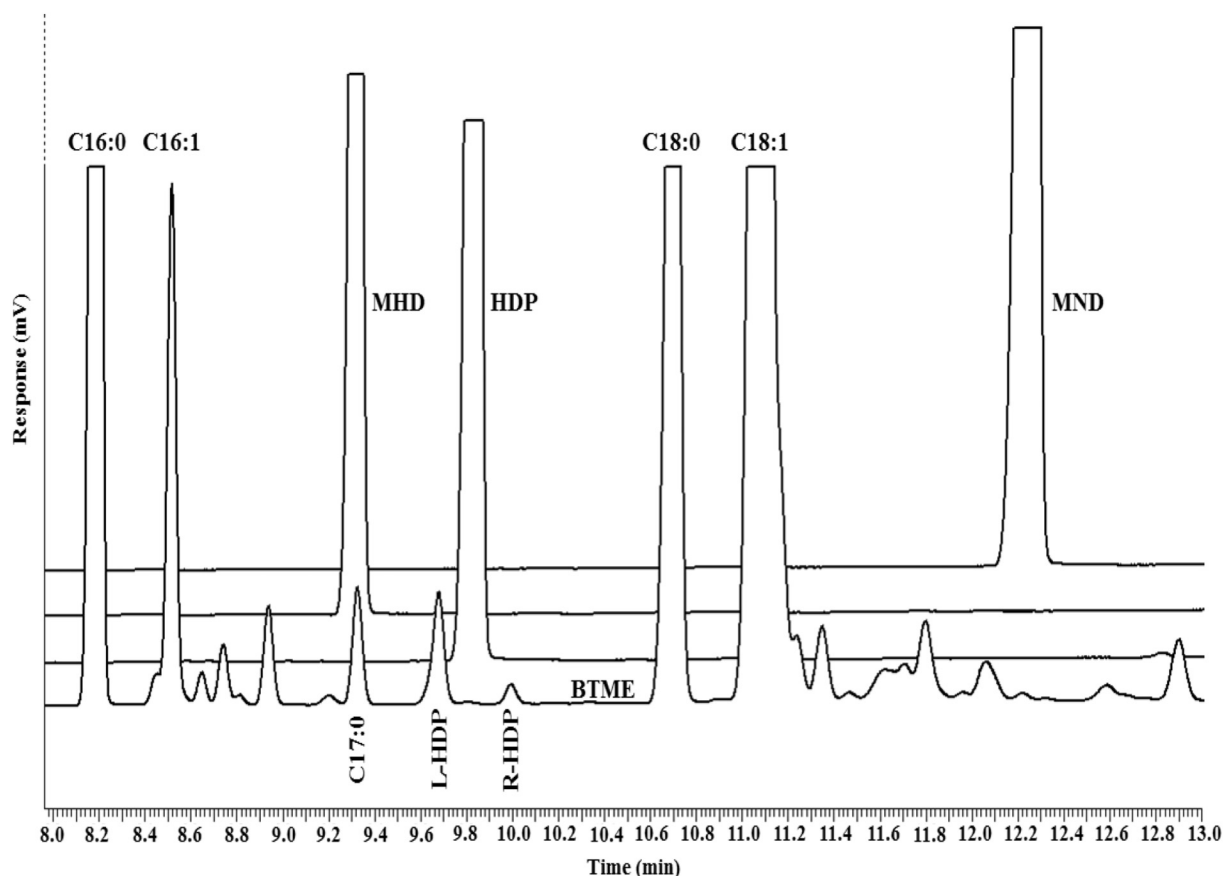


Fig. 2. Overlapping chromatograms of the main esters in the range of t_R : 8 to 13 min of a total of 22.91 min: the peaks of C16:0, C16:1, C17:0, L-HDP, R-HDP, C18:0 and C18:1 of BTME (blank), methyl heptadecanoate (MHD), hexadecyl propanoate (HDP) and methyl nonadecanoate (MND).

Table 1

Determination of retention time (t_R), peak area (A), peak height (h), resolution and tailing factor (T_f) resulting in relation to the HDP and its two adjacent peaks (L-HDP and R-HDP) of BTME for split mode of 20:1, 30:1 and 50:1.

Peak	Split	t_R min	RSD %	A [μ V·s]	RSD %	h [μ V]	RSD %	T_f	RSD %	^a L-HDP:HDP	^b R-HDP:HDP
L-HDP	20:1	9.67	0.05	2878	0.81	803	0.76	0.88	0.62	1.94	1.39
HDP		9.86	0.05	54,242	0.78	14,648	1.05	0.73	0.62		
R-HDP		10.00	0.05	514	1.36	160	1.07	0.91	1.02		
L-HDP	30:1	9.68	0.03	1973	1.23	557	1.08	0.88	0.75	1.87	1.51
HDP		9.89	0.03	39,567	0.99	11,169	0.96	0.77	0.86		
R-HDP		10.00	0.03	350	1.54	108	1.10	0.92	2.04		
L-HDP	50:1	9.67	0.09	1172	0.98	337	0.86	0.89	0.91	1.82	1.67
HDP		9.84	0.09	23,335	1.41	6882	1.44	0.84	0.80		
R-HDP		9.99	0.09	201	4.93	63	2.18	0.97	2.90		

Replicate: $n = 9$.

^a L-HDP:HDP: peak on the HDP left.

^b R-HDP:HDP: peak on the HDP right.

and CCME content, as well as for biodiesels produced from other feedstock, edible or non-edible plant oils and/or animal fats [6,17–21,30,42]. This is due to the retention time increasing from C16:1 (t_R : 8.49 min) to C18:0 (t_R : 10.67 min) since these biodiesels do not have fatty esters mentioned in this retention time range.

3.3. Trueness and precision of BTME content

The trueness test followed by statistical precision analysis is one of the most important criteria for judging analytical procedures in the development of analytical methodology and validation of the method [27,28]. Trueness expresses the proximity of the measured value in relation to true value. The precision measures the degree of concordance between the various values obtained experimentally through the variances. Therefore, the smaller the dispersion (standard deviation) of experimental measurements, the higher is its precision [27,28,35].

The trueness evaluation of BTME content was expressed as content of fatty esters in the biodiesel samples. It was performed by comparing the mean values through analysis of two sets of 7 samples of BTME, comparing the ISs HDP and MHD for each set of samples. The internal standardization method was applied to both sets, based on the method of EN 14103:2003 [8]. To determine the BTME content, using the MHD as ISR, Eqs. (2), (3) and (4) were used. Table 2 and Supporting Information (Tables S-4, S-5 and S-6) show the results obtained by these analyses. The response factor was assumed equal to one for all the fatty esters peaks to be integrated into the range from C6:0 to C24:1 [8,15].

Firstly, the variances resulting from each set of samples were

Table 2

Comparison of BTME content results, using HDP and MHD in the evaluation of trueness through statistical analysis by Fisher's and Student's t -tests.

Statistical analysis										
Standard	Mean (%) ^(a)	SD	s^2	RSD (%)	$F_{exp.}$	F_{CVF}	S_a	$t_{exp.}$	t_{CVS}	
MHD	97.18	0.82	0.67	0.84	1.22	4.284	0.75	1.37	2.178	
HDP	97.73	0.91	0.82	0.93						

t_{CVS} : critical values of Student's t distribution with 12 degrees of freedom.

F_{CVF} : critical values of F for the $p \leq 0.05$ with 6 degrees of freedom.

RSD (%): percent relative standard deviation.

S_a : aggregated standard deviation.

$n = 7$ for each standard.

SD: standard deviation.

$F_{exp.}$: F experimental.

$t_{exp.}$: t experimental.

s^2 : variance.

^a 95% confidence interval.

compared by Fisher's test [33,34], with 6 degrees of freedom. The calculated value of $F_{exp.}$ (1.22) was lower than the F_{CVF} (4.284). Thus, there is no significant difference between the two precisions (maximum level of 5%). A comparison of results between the averages of BTME content in biodiesel samples was evaluated by Student- t -test [33–35,43], with 12 degrees of freedom. The $t_{exp.}$ (1.37) was smaller in relation to t_{CVS} (2.178). It was demonstrated that the BTME content of the samples when using ISR (MHD) and ISI (HDP), were 97.1 and 97.7%, respectively. Thus, the calculated values are statistically equal to 95% confidence interval, confirmed by the null hypothesis adopted. These results justify HDP use as an IS in quantitative analysis to determine the BTME content through application of the method for internal standardization defined by EN 14103:2003 and EN 14103:2011 [8,15]. Another aspect to be highlighted is a 80% reduction in the concentration of HDP (2 mg mL^{-1}), compared with 10 mg mL^{-1} MHD as determined by EN 14103:2003 and EN 14103:2011 [8,15]. In this manner, it is possible to perform 5 times more analysis of samples of biodiesel with 1 g of HDP.

3.4. Repeatability between BTME content analysis

Repeatability is the precision of an analytical method operating under the same conditions for a short period of time; also called as intra-day precision [27–29]. In Table 3 and in the Supporting Information Table S-4 the results of seven samples analyzed with the concentration of 2 mg mL^{-1} HDP are shown. The calculated RSD (%) of the BTME in the sample was 0.93%, adequate for the intra-day precision, as defined by EN 14103:2003 [8], EN 14103:2011 [15], ICH [27] and USP [28].

3.5. Intermediate precision

The intermediate precision was evaluated by the extension of the circumstances established under which the process was destined to be used. The random effects of the precision of the analytical procedure were typical variations of analysis, such as three analysts on different

Table 3

Repeatability analysis of samples with the MDH and HDP in the determination of the BTME content.

Samples BTME content										
Standard	1	2	3	4	5	6	7	Mean (%)	RSD (%)	
HDP	96.0	97.4	97.8	98.1	97.6	98.2	99.0	97.7 ± 0.9	0.93	
MHD	98.4	96.2	97.7	97.8	96.6	96.4	97.2	97.2 ± 0.8	0.84	

$n = 3$ for each sample. RSD (%): percent relative standard deviation. Mean as 95% confidence interval.

Table 4
Evaluation of intermediate precision by different analysis with the HDP in the determination of BTME content.

Intermediate precision			
Analyst	BTME content (%)	Mean (%)	RSD (%)
A	98.65	99.12	1.30
B	98.13		
C	100.58		

RSD (%): percent relative standard deviation.

Table 5
Effects of the analytical parameters in the determination of BTME content to evaluate the robustness of the chromatographic method by Youden's test.

Analytical parameter (X/x)	BTME content (%)		$D_i^{(a-b)}$ (%)	SD_i (%)
	MCL/4 ^(a)	MLCL/4 ^(b)		
A/a Injector temperature (°C)	97.97	97.98	-0.02	0.58
B/b Detector temperature (°C)	98.16	97.79	0.36	
C/c Oven initial temperature (°C)	98.07	97.88	0.20	
D/d Heating rate of second ramp (°C min ⁻¹)	97.65	98.30	-0.65	
E/e Gas flow-rate (mL mL ⁻¹)	98.17	97.78	0.39	
F/f Split mode	97.91	98.04	-0.13	
G/g Injected volume (μL)	98.30	97.65	0.65	

$D_i^{(a-b)}$ - difference between BTME contents due to small variations in the analytical parameters (%).

SD_i - standard deviation of differences (%).

^a MCL/4 - mean of the four values corresponding to capital letters (%).

^b MLCL/4 - mean of the four values corresponding to lower case letters (%).

days with the application of same procedure and equipment. In this evaluation, it was observed that the results obtained (Table 4) for the BTME content for each of the analysts: A (Supporting Information Table S-7), B (Supporting Information Table S-8) and C (Supporting Information Table S-9), were 98.7, 98.1 and 100.6%, respectively, with mean value of 99.1%. The relative standard deviation percentage calculated for the measurements of the three different analysts results was 1.3%, considered appropriated for the validation of method [27,28].

3.6. Robustness of the new analytical method developed

The results obtained after performing eight chromatographic analyses are demonstrated in Table 5, (Supporting Information Tables S-10 and S-11). With the application of the criterion of Youden's test, the chromatographic method developed was shown to be highly robust when determining the BTME content, even when small variations in seven analytical parameters were introduced. The small modifications in the analytical parameters as injected volume (μL) was reduced by 50% and heating rate of second ramp (°C min⁻¹) increased by 6.7%. They caused the same effect with a maximum difference in BTME content in the order of 0.65%. The BTME content was exceptionally low and insignificant in routine analyses. This is justified by standard deviation differences of 0.58%, which were lower than RSD (%) ≤ 2% [31].

The quantification and detection limits were not evaluated, since the methodology objective is the purity. The linear range has not been demonstrated since the methodology is constructed on a single point calibration.

4. Conclusions

The method developed by GC-FID, which uses hexadecyl propanoate as an internal standard for the determination of BTME content,

was evaluated and showed a good selectivity, trueness, repeatability, intermediate precision, and robustness. In addition, the execution time of the chromatographic analysis was reduced, simpler and at a lower cost. For the reasons previously outlined in this study, hexadecyl propanoate could be adopted as internal standard in the analysis routines of biodiesel, after validation tests by correspondents' interlaboratory, for an improvement of EN 14103 in the future.

Author contributions

All authors have contributed in the writing of this manuscript. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgment

This work was supported by grants from the Brazilian agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES - Grant number: 88882.158705/2014-01)

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.030>.

References

- [1] M. Kumar, P. Ghosh, K. Khosla, I.S. Thakur, Biodiesel production from municipal secondary sludge, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 165–171, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.078>.
- [2] L. Qu, Z. Wang, J. Zhang, Influence of waste cooking oil biodiesel on oxidation reactivity and nanostructure of particulate matter from diesel engine, *Fuel* 181 (2016) 389–395, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.04.113>.
- [3] C. Muthukumara, R. Praniesh, P. Navamani, R. Swathi, G. Sharmila, N.M. Kumar, Process optimization and kinetic modeling of biodiesel production using non-edible *Madhuca indica* oil, *Fuel* 195 (2017) 217–225, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2017.01.060>.
- [4] Historical perspectives on vegetable oil-based diesel fuels, <http://aocs.files.cms-plus.com/LipidsLibrary/images/Importedfiles/lipidlibrary/history/Diesel/file.pdf>, (2001), Accessed date: 11 January 2017.
- [5] R. Nihom, C. Tongurai, Production development of ethyl ester biodiesel from palm oil using a continuous deglycerolisation process, *Fuel* 117 (2014) 926–931, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.10.018>.
- [6] Z.A.N. Shajaratun, Y.H. Taufiq-Yap, M.F.N. Rabiah, S.H. Teo, O.N. Syazwani, A. Islam, Production of biodiesel from palm oil using modified Malaysian natural dolomites, *Energy Convers. Manag.* 78 (2014) 738–744, <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2013.11.012>.
- [7] B.V. Siteo, A.D.V. Máquina, F.B. Santana, L.C. Gontijo, D.Q. Santos, W.B. Neto, Monitoring of biodiesel content and adulterant presence in methyl and ethyl biodiesels of jatropha in blends with mineral diesel using MIR spectrometry and multivariate control charts, *Fuel* 191 (2017) 290–299, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.11.078>.
- [8] EN 14103:2003, *Fat and Oil Derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) Determination of Ester and Linolenic Acid Methyl Esters Content*, (2003).
- [9] S. Schober, I. Seidl, M. Mittelbach, Ester content evaluation in biodiesel from animal fats and lauric oils, *J. Lipid Sci. Technol.* 108 (2006) 309–314, <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200500324>.
- [10] M.S.A. Moraes, L.C. Krause, M.E. da Cunha, C.S. Faccini, E.W. de Menezes, R.C. Veses, M.R.A. Rodrigues, E.B. Caramão, Tallow biodiesel: properties evaluation and consumption tests in a diesel engine, *Energy Fuel* 22 (2008) 1949–1954, <http://dx.doi.org/10.1021/ef7006535>.
- [11] NBR 15764:2009, Brazilian association of technical rules, http://www.abnt.org.br/imagens/normalizacao_homologacao/lista_de_publicacao_-2009.10.06_a_2009.10.30.pdf, (2009), Accessed date: 3 January 2017.
- [12] M. Ribani, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, L.F.C. Melo, Validation for chromatographic and electrophoretic methods, *Quim Nova* 27 (2004) 771–780, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>.
- [13] J.V. Visentainer, T. Claus, O.O. Santos Jr., L.U.R. Chiavelli, A.S. Maruyama, Analytical Aspects of the Flame Ionization Detection in Comparison With Mass Spectrometry With Emphasis on Fatty Acids and Their Esters, *Intech*, 2014, <http://dx.doi.org/10.5772/57333>.
- [14] F. Gasparini, J.R.O. Lima, Y.A. Ghani, R.R. Hatanaka, R.S. Sequinel, D.L. Flumignan, J.E. Oliveira, EN 14103 adjustments for biodiesel analysis from

- different raw materials, including animal tallow containing C17, World Renewable Energy Congress, 11 2011, pp. 101–108, <http://dx.doi.org/10.3384/ecp11057101>.
- [15] EN 14103:2011, Fat and Oil Derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) Determination of Ester and Linolenic Acid Methyl Esters Content, (2011).
- [16] K. Forfang, B. Zimmermann, G. Kosa, A. Kohler, V. Shapaval, FTIR spectroscopy for evaluation and monitoring of lipid extraction efficiency for oleaginous fungi, *PLoS One* 24 (2017) 1–17, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0170611>.
- [17] D. Singh, A. Chopra, R. Kumar, M.I.S. Sastry, M.B. Patel, B. Basu, Response factor correction for estimation of ester content in biodiesel, *Chromatographia* 77 (2014) 165–169, <http://dx.doi.org/10.1007/s10337-013-2589-1>.
- [18] A.B. Chhetri, M.S. Tango, S.M. Budge, K.C. Watts, M.R. Islam, Non-edible plant oils as new sources for biodiesel production, *Int. J. Mol. Sci.* 9 (2008) 169–180.
- [19] A.E. Atabani, A.S. Silitonga, H.C. Ong, T.M.I. Mahlia, H.H. Masjuki, I.A. Badruddin, H. Fayaz, Non-edible vegetable oils: acritical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 18 (2013) 211–245, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.10.013>.
- [20] I.B. Banković-Ilić, O.S. Stamenković, V.B. Veljković, Biodiesel production from non-edible plant oils, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16 (2012) 3621–3647, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.03.002>.
- [21] V.L. Pardo, C.A.M. Fagundes, S.S. Caldas, M.H. Kurz, R.M. Clementin, M.G.M. D'Oca, E.G. Primel, Development and validation of a method for the determination of fatty acid methyl ester contents in tung biodiesel and blends, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89 (2012) 631–637, <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-011-1948-z>.
- [22] Ministry of Mines and Energy, <http://www.mme.gov.br>, (2017), Accessed date: 30 January 2017.
- [23] T. Cachet, Guidelines for the quantitative gas chromatography of volatile flavouring substances, *Flavour Fragr. J.* 26 (2011) 297–355, <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.2061>.
- [24] L.F. Tietze, T. Eicher, *Reactions and Syntheses in the Organic Chemistry Laboratory*, University Science Books, Mill Valley, 1989, pp. 169–193.
- [25] R. Guzzato, T.L. Martini, D. Samios, The use of a modified TDSP for biodiesel production from soybean, linseed and waste cooking oil, *Fuel Process. Technol.* 92 (2011) 2083–2088, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2011.06.013>.
- [26] T. Cucu, B. De Meulenaer, Development of a quantitative GC-FID method for the determination of sucrose mono- and diesters in foods, *Food Addit. Contam.* 32 (2015) 1–10, <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2015.1072877>.
- [27] International Conference on Harmonization (ICH), *Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, (2005).
- [28] USP - The United States Pharmacopeia, Chapter 1225, *Validation of Compendial Procedures - USP 40-NF 35 and Chapter 621, Chromatography - USP 32- NF 27, The United States Pharmacopeia and National Formulary Rockville*, 2009.
- [29] M. Quintela, J. Báguena, G. Gotor, M.J. Blanco, F. Broto, Estimation of the uncertainty associated with the results based on the validation of chromatographic analysis procedures: application to the determination of chlorides by high performance liquid chromatography and of fatty acids by high resolution gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1223 (2012) 107–117, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.064>.
- [30] C.P. Prados, D.R. Rezende, L.R. Batista, M.I.R. Alves, N.R.A. Filho, Simultaneous gas chromatographic analysis of total esters, mono-, di- and triacylglycerides and free and total glycerol in methyl or ethyl biodiesel, *Fuel* 96 (2012) 476–481, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2011.11.060>.
- [31] E. Karageorgou, V. Samanidou, Youden test application in robustness assays during method validation, *J. Chromatogr. A* 1353 (2014) 131–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.050>.
- [32] H. Zhang, Z. Wang, O. Liu, Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids, *J. Pharm. Anal.* 5 (2015) 223–230, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpfa.2015.01.005>.
- [33] P. Bedregal, B. Torres, M. Ubillús, P. Mendoza, E. Montoya, Robustness in NAA evaluated by the Youden and Steiner test, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 278 (2008) 801–806, <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-008-1704-5>.
- [34] G.G. Shimamoto, M. Tubino, Alternative methods to quantify biodiesel in standard diesel-biodiesel blends and samples adulterated with vegetable oil through UV-visible spectroscopy, *Fuel* 186 (2016) 199–203, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.076>.
- [35] F. Rouessac, A. Rouessac, *Chemical analysis*, in: Steve Brooks (Ed.), *Modern Instrumentation Methods and Techniques*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England, 2007, pp. 501–518.
- [36] S.L. Arnold, F. Stevison, N. Isoherranen, Impact of sample matrix on accuracy of peptide quantification: assessment of calibrator and internal standard selection and method validation, *Anal. Chem.* 88 (2016) 746–753, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03004>.
- [37] L. Hejazi, D. Ebrahimi, M. Guilhaus, D.B. Hibbert, Determination of the composition of fatty acid mixtures using GC × FI-MS: a comprehensive two-dimensional separation approach, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1450–1458, <http://dx.doi.org/10.1021/ac802277c>.
- [38] K. Shimizu, Y. Ando, Gas chromatographic separation of docosenoic acid positional isomers on an SLB-IL100 ionic liquid, *J. Oleo Sci.* 68 (2012) 421–426, <http://dx.doi.org/10.5650/jos.61.421>.
- [39] D.L. Flumignan, F.O. Ferreira, A.G. Tininis, M.N. Lopes, J.E. de Oliveira, Development, optimization and validation of gas chromatographic fingerprinting of Brazilian commercial gasoline for quality control, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 181–188, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.06.040>.
- [40] ASTM STP 865, *Validation and Predictability of Laboratory Methods for Assessing the Fate and Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems*, ASTM International, 1985 Available in www.astm.org, Accessed date: 17 January 2017.
- [41] I.C. César, G.A. Pianetti, Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test, *Braz. J. Pharm. Sci.* 45 (2009) 235–240, <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502009000200007>.
- [42] L.A. Sobrado, L. Freije-Carrelo, M. Moldovan, J.R. Encinar, J.I.G. Alonso, Comparison of gas chromatography-combustion-mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detector for the determination of fatty acid methyl esters in biodiesel without specific standards, *J. Chromatogr. A* 1457 (2016) 134–143, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.033>.
- [43] K. Dettmer-Wilde, W. Engewald, *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference*, Springer, New York, 2014, pp. 205–248, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-54640-2_6 (pp. 503–526 (doi: 10.1007/978-3-642-54640-2_14)).

Appendix A. Supplementary data

Table S-1. Analytical parameters and small variations to evaluate the robustness of the chromatographic method for BTME quantification.

Analytical parameter		Nominal condition^(a)		Variation^(b)	
A/a	Injector temperature (°C)	250	- A	247	- a
B/b	Detector temperature (°C)	250	- B	247	- b
C/c	Oven initial temperature (°C)	130	- C	133	- c
D/d	Heating rate of second ramp (°C/min)	2.8	- D	3.0	- d
E/e	Gas flow-rate (ml/min)	1.0	- E	1.3	- e
F/f	Split mode	1:30	- F	1:27	- f
G/g	Injected volume (μL)	1.0	- G	0.5	- g

(a) Analytical parameters optimized in chromatographic analysis.

(b) Small variations in analytical parameters.

Table S-2. Factorial combination of the analytical parameters to evaluate the robustness of the chromatographic method through Youden's test.

Analytical parameter (X/x)	Factorial combination							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Result ^(a)	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

(a) Chromatographic analyzes from s to z.

Table S-3. Determination of retention time (t_R), peak area (A), peak height (h), resolution and tailing factor (T_f) resulting in relation to the HDP and its two adjacent peaks (L-HDP and R-HDP) of BTME for split mode of 30:1.

Peak	t_R min	RSD %	A [$\mu V \cdot sec$]	RSD %	h [μV]	RSD %	T_f	RSD %	^a L-HDP:HDP	^b R-HDP:HDP
L-HDP[†]	9.65	0.04	1919	1.39	545	1.43	0.88	0.55		
HDP	9.83	0.04	35309	1.26	10085	1.15	0.78	0.78	1.88	1.54
R-HDP	9.97	0.04	338	1.95	105	1.60	0.94	1.79		
L-HDP^{††}	9.56	0.05	1979	1.40	568	1.69	0.88	0.90		
HDP	9.73	0.06	34447	1.43	9949	1.30	0.79	0.58	1.91	1.53
R-HDP	9.87	0.06	350	2.11	109	1.74	0.95	1.40		

Replicate: $n^{\dagger} = 7$ and $n^{\dagger\dagger} = 5$.

(a) L-HDP:HDP: peak on the HDP left..

(b) R-HDP:HDP: peak on the HDP right.

Table S-4. Values of variables to determine the BTME content with the HDP as ISI in the accuracy analysis.

Sample Replicate	m_{BTME} (mg)	C_{BTME} (mg/mL)	∑A (mV)	C_{ISI} (mg/mL)	A_{ISI} (mV)	BTME content (%)
1.1	50.5	10.10	212235.61	2.005	36192.13	
1.2	50.5	10.10	210979.71	2.005	36185.25	96.03
1.3	50.5	10.10	210668.91	2.005	36199.84	
2.1	50.8	10.16	210264.75	2.005	35406.32	
2.2	50.8	10.16	209463.47	2.005	35310.71	97.43
2.3	50.8	10.16	206947.81	2.005	34830.00	
3.1	50.1	10.02	204172.88	2.005	34662.96	
3.2	50.1	10.02	205231.11	2.005	34856.29	97.79
3.3	50.1	10.02	204865.89	2.005	34811.50	
4.1	50.8	10.16	209924.94	2.005	35176.43	
4.2	50.8	10.16	209641.43	2.005	35096.07	98.08
4.3	50.8	10.16	211641.68	2.005	35449.32	
5.1	50.5	10.10	208557.12	2.005	35185.62	
5.2	50.5	10.10	206431.93	2.005	35030.77	97.57
5.3	50.5	10.10	207277.88	2.005	34976.07	
6.1	50.5	10.10	208233.14	2.005	34989.85	
6.2	50.5	10.10	209871.23	2.005	35279.58	98.19
6.3	50.5	10.10	210607.70	2.005	35456.57	
7.1	50.6	10.12	213254.44	2.005	35522.36	
7.2	50.6	10.12	212585.05	2.005	35487.98	98.99
7.3	50.6	10.12	212175.61	2.005	35376.27	
		Mean	209287.25	-	35308.66	97.73
		SD	2636.61	-	444.00	0.91
		RSD (%)	1.26	-	1.26	0.93

Table S-5. Values of variables to determine the specific area of C17:0 present in BTME (blank) in the accuracy analysis.

Sample Replicate	m_{BTME} (mg)	C_{BTME} (mg/mL)	A_{C17:0 BTME} (mV)	A_{C17:0 BTME}/C_{BTME} (mV/mg/mL)
1.1	50.4	10.08	1709.41	169.58
1.2	50.4	10.08	1718.51	170.49
1.3	50.4	10.08	1749.50	173.56
2.1	50.6	10.12	1710.07	168.98
2.2	50.6	10.12	1730.63	171.01
2.3	50.6	10.12	1745.91	172.52
3.1	50.7	10.14	1774.53	175.00
3.2	50.7	10.14	1811.53	178.65
3.3	50.7	10.14	1799.12	177.43
4.1	50.4	10.08	1783.68	176.95
4.2	50.4	10.08	1767.07	175.30
4.3	50.4	10.08	1706.63	169.31
5.1	50.0	10.00	1692.13	169.21
5.2	50.0	10.00	1753.59	175.36
5.3	50.0	10.00	1730.76	173.08
6.1	50.5	10.10	1763.30	174.58
6.2	50.5	10.10	1756.90	173.95
6.3	50.5	10.10	1783.52	176.59
7.1	50.3	10.06	1747.77	173.73
7.2	50.3	10.06	1783.07	177.24
7.3	50.3	10.06	1762.53	175.20
			Mean	173.70
			SD	2.98
			RSD (%)	1.72

Table S-6. Values of variables to determine BTME content with the MHD as ISR in the accuracy analysis.

Sample Replicate	m_{BTME} (mg)	C_{BTME} (mg/mL)	ΣA (mV)	C_{ISR} (mg/mL)	AA (mV)	CA_{ISR} (mV)	BTME content (%) ^(a)
1.1	50.3	10.06	206097.77	2.016	35088.41	34738.23	
1.2	50.3	10.06	200821.98	2.016	34411.33	34061.15	98.39
1.3	50.3	10.06	207833.04	2.016	35576.11	35225.93	
2.1	50.3	10.06	204767.67	2.016	35723.45	35373.27	
2.2	50.3	10.06	203286.58	2.016	35455.49	35105.31	96.19
2.3	50.3	10.06	204634.38	2.016	35508.63	35158.45	
3.1	50.0	10.00	204964.35	2.016	35550.26	35200.08	
3.2	50.0	10.00	206286.20	2.016	35750.14	35399.96	97.69
3.3	50.0	10.00	206853.35	2.016	35488.16	35137.98	
4.1	50.4	10.08	209073.48	2.016	35550.26	35200.08	
4.2	50.4	10.08	205189.44	2.016	35210.46	34860.28	97.77
4.3	50.4	10.08	204747.57	2.016	35408.84	35058.66	
5.1	50.2	10.04	204035.61	2.016	35407.28	35057.10	
5.2	50.2	10.04	206502.87	2.016	35704.22	35354.04	96.62
5.3	50.2	10.04	202651.39	2.016	35442.39	35092.21	
6.1	50.0	10.00	203214.90	2.016	35501.50	35151.32	
6.2	50.0	10.00	204062.51	2.016	35667.71	35317.53	96.36
6.3	50.0	10.00	203638.70	2.016	35584.61	35234.43	
7.1	50.3	10.06	196346.46	2.016	33852.72	33502.54	
7.2	50.3	10.06	208438.11	2.016	36010.21	35660.03	97.23
7.3	50.3	10.06	206946.35	2.016	35724.69	35374.51	
		Mean	204780.61	-	35410.33	35060.14	97.18
		SD	2790.15	-	475.22	475.22	0.82
		RSD (%)	1.36	-	1.34	1.36	0.84

^(a)95% confidence interval.

Table S-7. Analysis of the results of analyst A obtained in the intermediate precision test to determine BTME content with the HDP as ISI.

Sample Replicate	m_{BTME} (mg)	C_{BTME} (mg/mL)	ΣA (mV)	C_{ISI} (mg/mL ¹)	A_{ISI} (mV)	BTME content (%)^(a)
1.1	50.0	10.00	210800.73	2.023	36336.56	
1.2	50.0	10.00	210226.22	2.023	36154.63	97.48
1.3	50.0	10.00	210717.38	2.023	36084.22	
2.1	50.6	10.12	208170.93	2.023	35015.53	
2.2	50.6	10.12	209933.39	2.023	35186.52	99.30
2.3	50.6	10.12	212837.56	2.023	35525.96	
3.1	50.1	10.02	207028.50	2.023	35216.39	
3.2	50.1	10.02	207657.41	2.023	35316.85	98.55
3.3	50.1	10.02	209047.12	2.023	35520.05	
4.1	50.3	10.06	209102.89	2.023	35157.50	
4.2	50.3	10.06	209582.04	2.023	35212.49	99.26
4.3	50.3	10.06	209999.45	2.023	35543.49	
		Mean	209591.97	-	35522.52	98.65
		SD	1561.35	-	438.33	0.85
		RSD (%)	0.74	-	1.23	0.86

^(a)95% confidence interval.

Table S-8. Analysis of the results of analyst B obtained in the intermediate precision test to determine BTME content with the HDP as ISI.

Sample Replicate	m_{BTME} (mg)	C_{BTME} (mg/mL)	ΣA (mV)	C_{ISI} (mg/mL)	A_{ISI} (mV)	BTME content (%)^(a)
1.1	50.6	10.12	211597.72	2.005	35690.94	
1.2	50.6	10.12	212416.22	2.005	35761.57	97.76
1.3	50.6	10.12	211638.59	2.005	35655.58	
2.1	50.3	10.06	207335.27	2.005	34968.41	
2.2	50.3	10.06	207611.78	2.005	35058.43	98.17
2.3	50.3	10.06	207697.21	2.005	35042.92	
3.1	50.6	10.12	206851.74	2.005	34565.49	
3.2	50.6	10.12	207078.22	2.005	34658.17	98.73
3.3	50.6	10.12	208407.86	2.005	34782.53	
4.1	50.1	10.02	208069.82	2.005	35188.14	
4.2	50.1	10.02	207304.74	2.005	35279.52	97.88
4.3	50.1	10.02	205462.85	2.005	34902.45	
		Mean	208456.00	-	35129.51	98.13
		SD	2197.83	-	400.92	0.43
		RSD (%)	1.05	-	1,14	0.44

^(a)95% confidence interval.

Table S-9. Analysis of the results of analyst C obtained in the intermediate precision test to determine the BTME content with the HDP as ISI.

Sample Replicate	m_{BTME} (mg)	C_{BTME} (mg/mL)	ΣA (mV)	C_{ISI} (mg/mL)	A_{ISI} (mV)	BTME content (%)^(a)
1.1	51.5	10.30	210094.01	2.023	34819.29	
1.2	51.5	10.30	210002.79	2.023	34490.70	99.38
1.3	51.5	10.30	210040.69	2.023	34673.35	
2.1	51.1	10.22	212595.07	2.023	34621.88	
2.2	51.1	10.22	212832.98	2.023	34544.57	101.46
2.3	51.1	10.22	212723.40	2.023	35011.52	
3.1	51.2	10.24	210046.58	2.023	34606.02	
3.2	51.2	10.24	210018.38	2.023	34556.40	100.03
3.3	51.2	10.24	210096.55	2.023	34768.79	
4.1	51.5	10.30	213708.68	2.023	34733.38	
4.2	51.5	10.30	213746.45	2.023	34622.37	101.45
4.3	51.5	10.30	213890.54	2.023	34671.86	
		Mean	211649.68	-	34676.68	100.58
		SD	1718.05	-	141.95	1.04
		RSD (%)	0.81	-	0.41	1.04

^(a)95% confidence interval.

Table S-10. Results of BTME content after eight analyses of factorial combinations.

Sample Replicate	m_{BTME} (mg)	C_{BTME} (mg/mL)	ΣA (mV)	C_{ISI} (mg/mL)	A_{ISI} (mV)	BTME content (%)	
1.1	51.8	10.36	282998.14	2.128	49056.93		
1.2	51.8	10.36	276449.00	2.128	47655.00	98.37	<i>s</i>
1.3	51.8	10.36	282742.43	2.128	48764.94		
2.1	51.8	10.36	282667.00	2.128	49397.94		
2.2	51.8	10.36	267358.90	2.128	46562.15	97.27	<i>t</i>
2.3	51.8	10.36	267922.90	2.128	46656.18		
3.1	51.8	10.36	263345.50	2.128	45879.82		
3.2	51.8	10.36	274036.20	2.128	47289.42	98.15	<i>u</i>
3.3	51.8	10.36	268397.78	2.128	46274.85		
4.1	51.8	10.36	280940.00	2.128	48709.55		
4.2	51.8	10.36	276178.20	2.128	47997.70	98.08	<i>v</i>
4.3	51.8	10.36	275155.10	2.128	47420.00		
5.1	51.8	10.36	272917.70	2.128	47375.70		
5.2	51.8	10.36	269340.90	2.128	46417.50	98.0	<i>w</i>
5.3	51.8	10.36	267102.40	2.128	46453.30		
6.1	51.8	10.36	463519.40	2.128	79457.60		
6.2	51.8	10.36	409477.40	2.128	70612.20	98.98	<i>x</i>
6.3	51.8	10.36	414270.30	2.128	71137.80		
7.1	51.8	10.36	320641.90	2.128	55702.80		
7.2	51.8	10.36	317063.90	2.128	55054.60	97.77	<i>y</i>
7.3	51.8	10.36	325381.00	2.128	56452.50		
8.1	51.8	10.36	127078.40	2.128	22184.17		
8.2	51.8	10.36	123278.30	2.128	21529.50	97.18	<i>z</i>
8.3	51.8	10.36	122926.00	2.128	21416.54		
					Mean	97.98	
					SD	0.58	
					RSD (%)	0.60	

Table S-11. Results of influence of the effect with the variations of each analytical parameter in the BTME content.

Analytical parameter	$(ML/4)^{(a)}$				$(LCL/4)^{(b)}$				Mean (%)	
	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>		
A/a	98.37	97.27	98.15	98.08	97.97	98.0	98.98	97.77	97.18	97.98
B/b	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	98.16	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	97.79
C/c	<i>s</i>	<i>u</i>	<i>w</i>	<i>y</i>	98.07	<i>t</i>	<i>v</i>	<i>x</i>	<i>z</i>	97.88
D/d	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	97.65	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	98.30
E/e	<i>s</i>	<i>u</i>	<i>x</i>	<i>z</i>	98.17	<i>t</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>y</i>	97.78
F/f	<i>s</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>z</i>	97.91	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	98.04
G/g	<i>s</i>	<i>v</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	98.30	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>w</i>	<i>z</i>	97.65

(a) $ML/4$ is the mean of the four values corresponding to capital letters (%).

(b) $LCL/4$ is the mean of the four values corresponding to lower case letters (%).

5. DISCUSSÃO GERAL

No Capítulo I foi apresentado o estudo sobre prospecção, isolamento e caracterização de microrganismos com potencial de metabolizar hidrocarbonetos de petróleo para a biorremediação de ambientes marinhos impactados por petróleo.

Os derramamentos de petróleo continuam a ocorrer no ambiente marinho, causando prejuízos ambientais e socioeconômicos desde o início da exploração até os dias atuais (WAN & CHEN, 2018). A biorremediação tem sido considerada uma técnica eficiente, econômica, versátil e ambientalmente sustentável devido à capacidade de microrganismos especializados em biodegradar hidrocarbonetos de petróleo. Sabe-se, também, que as bactérias são os microrganismos predominantes dentro da comunidade microbiana com capacidade de utilizar petróleo como fonte de carbono para o seu desenvolvimento (MEYER *et al.*, 2014; AFENYO *et al.*, 2016; WAN & CHEN, 2018).

Neste trabalho, a estratégia de prospectar no PNLP foi com o objetivo de selecionarmos microrganismos adaptados às condições físico-químicas e ambientais do ambiente marinho e com potencial de biodegradarem os hidrocarbonetos de petróleo. A abordagem para o isolamento destes microrganismos das amostras coletadas na prospecção foi pela técnica de enriquecimento por pressão seletiva, tendo como única fonte de carbono e energia o petróleo, que foi adicionada na água do mar estéril. Esta técnica já foi amplamente relatada na literatura (BENTO *et al.*, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2012; COLLA *et al.*, 2014; DÖRR DE QUADROS *et al.*, 2016; McFARLIN *et al.*, 2014 e 2018). Um exemplo da eficácia desta estratégia, e utilizada por DENG *et al.*, (2014); SWAATHY *et al.*, (2014); CHEN *et al.*, (2017), foi no isolamento de bactérias halotolerantes a ampla faixa de

salinidade com capacidade de metabolizarem hidrocarbonetos de petróleo em ambiente marinho, corroborando com o ambiente onde nós prospectamos.

Esta estratégia foi fundamentada por MAIER & GENTRY, (2015); ABBASIAN *et al.*, (2016). Eles descreveram que ambientes com histórico de contaminação natural ou antropogênica por petróleo viabilizam a adaptação e seleção da comunidade heterotrófica a metabolizar os hidrocarbonetos que compõem o petróleo, como fonte de carbono e energia, pela indução de enzimas necessárias para a biodegradação. O melhoramento genético também pode ocorrer por mutação ou transferência genética horizontal, resultam em novas capacidades metabólicas para o desenvolvimento da microbiota nativa.

As técnicas de triagem adotadas neste trabalho, e descritas nos testes preliminares, foram essenciais por serem convenientes para realizar a seleção entre diversos isolados, que constava de 25 isolados pré-selecionados. Técnicas estas publicadas por SIEGMUND & WAGNER, (1991); BRADDOCK & CATTERALL, (1999); RICHARD & VOGEL, (1999); RAHMAN *et al.*, (2010); CERQUEIRA *et al.*, (2012); COLLA *et al.*, (2014); ALMEIDA *et al.*, (2017). Para tanto, nós realizamos os experimentos utilizando o indicador redox TTC CTAB/Azul de metílico e avaliação da capacidade do isolado em acessar a fonte de carbono (petróleo Bazu) em meio sólido (BH/Bazu). O teste do indicador redox TTC, confirmou que estes isolados pré-selecionados metabolizavam o contaminante. Esta técnica se baseia na expressão da atividade metabólica ao utilizar contaminante como fonte de carbono e energia. O ensaio com o CTAB/Azul de metílico demonstrou quais entre estes pré-selecionados tinham a capacidade de produzir biossurfactantes para biodisponibilizar o contaminante durante a biodegradação. Entretanto, no teste do BH/Bazu foi possível aumentar o grau de seletividade entre os pré-selecionados. Neste experimento, ficou constatado que apenas 5 (20 %) dos isolados pré-selecionados foram capazes de demonstrar desenvolvimento celular,

ao metabolizar a fonte de carbono de 0,02 % de petróleo Bazu, suplementado ao meio mineral Bushnell-Haas.

Após a seleção dos isolados pré-selecionados foi realizada a identificação molecular com base no sequenciamento parcial dos genes 16S rRNA e 5.8S rRNA, adotada por ALMEIDA *et al.*, (2017); ZAFRA *et al.*, (2017); TKAVC *et al.*, (2018). Entre os cinco isolados selecionados, três não são patogênicos. *B. methylotrophicus* SAMPNLPB5 e *P. sihuiensis* SPNLPB7 foram isolados das amostras de sedimento com água do mar e do sedimento, respectivamente. Estas bactérias já foram relatadas na literatura como sendo capazes de metabolizar hidrocarbonetos de petróleo (CERQUEIRA *et al.*, 2012; DÖRR DE QUADROS *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017; ROY *et al.*, 2018). A exceção foi *A. polymorphus* AMPNLPB25, isolada da amostra coletada da água do mar, que até o momento não teve relatos na literatura sobre a capacidade de biodegradar hidrocarbonetos de petróleo.

Uma segunda abordagem foi o monitoramento do desenvolvimento celular em tempo real de *B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e *A. polymorphus*, inoculando-os em meio mineral Bushnell-Haas pulverizado com petróleo Bazu. Neste experimento, ficou constatado que a formação de halo durante o desenvolvimento celular, ratificou que estas bactérias metabolizavam os hidrocarbonetos presentes no petróleo, como fonte de carbono e energia, corroborando com KIYOHARA *et al.*, (1982); ARULAZHAGAN & VASUDEVAN (2011). Entretanto, ao submeter estas bactérias nas mesmas condições experimentais, mas tendo como fonte de carbono e energia a mistura de PAHs, somente o *A. polymorphus*, não apresentou resultados significativos, como as demais bactérias.

O desenvolvimento bacteriano em água do mar contendo exclusivamente hidrocarbonetos alifáticos e PAHs também foi avaliado pelo número de células viáveis no transcorrer do cultivo, do tempo zero (10^5 UFC/mL) até 46 dias (aproximadamente 10^9

UFC/mL) de incubação. O aumento no número de células viáveis só foi possível, devido a utilização dos macro e micronutrientes presentes na água do mar (Tabela 7), necessários para a formação dos constituintes celulares básicos, como os ácidos nucleicos, moléculas energéticas (ATP), proteínas e enzimas para o desenvolvimento celular, além dos contaminantes como única fonte de carbono e energia. Mesmo no ambiente com 3,5 % de salinidade e pH 8,1, o desenvolvimento celular não foi inibido, comprovando serem halotolerantes a esta concentração de NaCl, corroborando com a teoria de MAIER & GENTRY, (2015); ABBASIAN *et al.*, (2016) e com os trabalhos da literatura (BENTO *et al.*, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2012; PALIWAL *et al.*, 2012; COLLA *et al.*, 2014; DENG *et al.*, 2014; SWAATHY *et al.*, 2014; DÖRR DE QUADROS *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017; McFARLIN *et al.*, 2014 e 2018; ROY *et al.*, 2018).

Nos testes quantitativos foi avaliada a eficiência destas bactérias (*B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e *A. polymorphus*), em metabolizar os contaminantes em água do mar, expresso em percentuais de biodegradação. Foi possível constatar que, estas bactérias biodegradaram até 92,1 % e 42,4 % da fração saturada, a mais abundante (Tabela 5 e Figura 9), presente no petróleo Bazu, os hidrocarbonetos alifáticos de cadeia média (C8 a C18) e de cadeia longa (C19 a C33), respectivamente, além de 31,1 % do isoprenóide (pristano), apenas pelo *B. methylotrophicus*. Nas mesmas condições de incubação, as bactérias biodegradaram 46 % em média de antraceno. Entretanto, a biodegradação do fenantreno (33,9 %) e pireno (35,3 %), foi atingida somente por *B. methylotrophicus* e *P. sihuiensis*, respectivamente.

Segundo MOHAMED *et al.*, (2006); TOLEDO *et al.*, (2006); VERMA *et al.*, (2006); CERQUEIRA *et al.*, (2011), mesmo para culturas isoladas, existe uma ordem preferencial decrescente de biodegradação: alcanos lineares não ramificados > alcanos de cadeia linear

ramificada > alcenos de cadeia ramificada > monoaromáticos > cicloalcanos > poliaromáticos > asfaltenos, o que explica os percentuais de biodegradação apresentados por estas bactérias dos alifáticos não ramificados, seguidos pelos alcanos ramificados como o pristano e o fitano. Entre os alcanos alifáticos ramificados, o efeito estérico predomina, o que torna os isoprenóides mais recalcitrantes (SILVA *et al.*, 2007; PAUDYN *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2011; MAIER & GENTRY, 2015). Os resultados apresentados pela análise do petróleo Bazu, possibilitaram categorizá-lo como petróleo leve, predominando os hidrocarbonetos alifáticos saturados, corroborando com BATA *et al.*, (2018); MAHJOUBI *et al.*, (2018).

Os percentuais de biodegradação dos PAHs foram inferiores aos dos alcanos alifáticos, pois estes policíclicos aromáticos também são uma classe de contaminantes ambientais mais recalcitrantes à biodegradação. A suscetibilidade à oxidação diminui quando o número de anéis aromáticos na molécula aumentou. Segundo BISHT *et al.*, (2015); MAIER & GENTRY (2015), os PAHs de baixa massa molecular (2 ou 3 anéis) são mais suscetíveis a biodegradação ao posto dos PAHs de elevada massa molecular (4 ou mais anéis), que são influenciados pela geometria molecular e o padrão de ligação do anel, aumentam a hidrofobicidade da molécula, reduzindo a solubilidade no meio aquoso (KANALY & HARAYAMA, 2000).

De acordo com HAMED *et al.*, (2010); McFARLIN *et al.*, (2014), se torna difícil um único microrganismo biodegradar todos os componentes do petróleo de forma linear durante a biodegradação. A composição variável dos constituintes do petróleo que contém alcanos não ramificados e ramificados, compostos aromáticos policíclicos e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio, por exemplo, um dos fatores limitantes (Segundo BATA *et al.*, 2018; MAHJOUBI *et al.*, 2018).

Independente dos percentuais de biodegradação e a extensão destes, a hipótese para a biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos e dos PAHs por *B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e *A. polymorphus*, ter ocorrido, sugerindo a expressão de genes alcano monooxigenase (*AlkB*) e naftaleno dioxigenase (*Nah*), que codificam os as enzimas alcanos hidroxilases que oxidam os hidrocarbonetos de petróleo na primeira etapa, envolvida no metabolismo de alcanos alifáticos e PAHs (LIU *et al.*, 2015; MAIER & GENTRY, 2015; PENG *et al.*, 2015; ABBASIAN *et al.*, 2016; JOUANNEAU *et al.*, 2016; NIE *et al.*, 2017).

Ao término dos experimentos de biodegradação (46 dias) foram identificados biossurfactantes lipopeptídeos (surfactinas e iturinas) e glicolipídios (mono e di-ramnolipídios), sintetizados por *B. methylotrophicus* e *P. sihuiensis*, respectivamente, independente da fonte de carbono que estavam metabolizando no cultivo em meio líquido. *P. sihuiensis* apresentou a maior redução da tensão superficial do inóculo de biodegradação após a extração das células, de 66,3 para 47,9 mN/m e atividade emulsificante de 37 %, no cultivo contendo hidrocarbonetos alifáticos. No processo de biodegradação dos contaminantes é muito importante que a microbiota bacteriana também tenha a capacidade de produzir biossurfactante e bioemulsificantes. Estes tensoativos auxiliam e propiciam o aumento da biodisponibilidade do contaminante ao ataque microbiano e, assim, obter melhores percentuais de biodegradação (CERQUEIRA *et al.*, 2011; UZOIGWE *et al.*, 2015; SHAO *et al.*, 2017; GEETHA *et al.*, 2018; MORO *et al.*, 2018; NAYARISSERI *et al.*, 2018; PATOWARY *et al.*, 2018). Para que os percentuais e extensão da biodegradação possam ser melhores dos que foram apresentados, o tempo de incubação terá que ser maior, possibilitando também, o aumento na concentração de biossurfactantes, melhorando a biodisponibilidade do contaminante.

A remoção de petróleo não recuperado do meio ambiente depende principalmente de processos biológicos como a biodegradação. Os microrganismos desempenham um papel crucial na remoção do petróleo e têm mostrado a capacidade de reduzir o impacto ambiental de longo prazo, como os desastres do Exxon Valdez no Alasca (1989) e Deepwater Horizon no Golfo do México (2010), por exemplo (ATLAS & HAZEN, 2011).

Cabe ressaltar que no Brasil existem poucos trabalhos tratando sobre o processo de biodegradação em ambientes marinhos. Dessa forma, torna-se relevante a abordagem deste tema no cenário atual. Portanto, à medida que mais conhecimento é disponibilizado sobre os fatores que influenciam a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo derramado nos mares do ártico até os dos trópicos, melhor será o desenvolvimento de planos de contingência para a resposta aos derramamentos.

O estudo do Capítulo II teve como objetivo sintetizar padrões internos para o desenvolvimento e validação de metodologia analítica por GC-FID, para determinar do teor de ésteres metílicos ou etílicos a partir de matérias-primas convencionais e não convencionais.

Os ésteres graxos foram obtidos pelo método da esterificação de Fischer, a partir de álcool de cadeia longa com ácidos graxos de cadeia curta. Estes ésteres apresentam características térmicas e químicas comparáveis aos ésteres carboxílicos, obtidos a partir ácidos carboxílicos de cadeia longa com álcool de cadeia curta, utilizados como padrões internos pelas normas EN 14103 (2003 e 2011) e NBR 15764:2009.

A diferença marcante dos ésteres sintetizados neste trabalho está relacionada à isomeria de posição quando comparados com os ésteres obtidos de ácido carboxílicos (VANNINI *et al.*, 2015). Isômeros de posição têm propriedades físicas que conferem

seletividade e resolução adequadas quando aplicados em técnicas cromatográficas (YOSHINAGA *et al.*, 2014). O que foi demonstrado pelos resultados de seletividade com o propanoato e o butanoato de hexadecila para biodiesel metílico e etílico, respectivamente, sintetizados a partir de gordura animal.

As normas EN 14103 (2003 e 2011) e NBR 15764: 2009, estabelecidas para determinar a pureza de biodiesel obtidos a partir de matérias-primas de oleaginosas, gordura animal e microrganismos oleaginosos, primeira, segunda e terceira gerações, respectivamente, são adotadas pela ANP. Entretanto, os padrões internos adotados pelas normas em muitos casos, fazem parte da mistura de ésteres após a síntese de biodiesel.

Os ésteres sintetizados neste estudo são adequados a todos os requisitos de um bom padrão interno, como estar ausente na amostra a ser analisada, principalmente, corroborando com CACHET *et al.*, (2011). Outro requisito importante é o grau de pureza. Os resultados apresentados, conferem a estes ésteres teor de pureza superior a 99 %, estando adequados as exigências das normas EN 14103 (2003 e 2011) e pela ANP.

O etanoato e propanoato de hexadecila tiveram seus empregos avaliados como padrões internos para a determinação da pureza de biodiesel e seus resultados encontram-se publicados em periódicos especializadas na área, com os títulos de: *GC-FID methodology validation for the fatty esters content determination in biodiesel with hexadecyl acetate as the internal standard*, (BRAUN *et al.*, 2017) e *Development and validation of analytical methodology by GC-FID using hexadecyl propanoate as an internal standard to determine the bovine tallow methyl esters content*, (EVANDRO PEREIRA *et al.*, 2018; Capítulo III).

A utilização do propanoato de hexadecila como padrão interno, na validação do método desenvolvido, para determinar o teor de pureza de biodiesel metílico a partir de gordura bovina, por GC-FID, foi aprovada em todos os requisitos analíticos (seletividade,

resolução, exatidão, repetitividade, precisão intermediária e robustez) aos quais foi submetido. Além disso, este método desenvolvido, reduziu o tempo de análise em 26,1 %, e a concentração de padrão interno em 80 %, possibilitando a realização de 5x mais análises, quando comparado com as normas EN 14103 (2003 e 2011).

6. CONCLUSÃO GERAL

O estudo do Capítulo I mostrou a seleção e identificação das bactérias *Bacillus methylotrophicus*, *Pseudomonas sihuiensis* e *Ancylobacter polymorphus*, com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e PAHs de amostras coletadas com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. De acordo com as características avaliadas, estas bactérias demonstraram capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em condições do ambiente marinho (salinidade, nutricional e pH características da água do mar). Estas características apontam as espécies bacterianas estudadas como candidatas a comporem estudos com biorremediação de ambiente marinho, pois trata-se de uma estratégia ecologicamente aceita para a mitigação de impactos ambientais de diversos ambientes poluídos por petróleo.

Os estudos apresentados no Capítulo II demonstraram ser possível sintetizar ésteres graxos a partir de álcool de cadeia longa com ácidos carboxílicos de cadeia curta, para serem empregados como padrões internos na determinação da pureza de biodiesel metílico e etílico a partir de matérias-primas convencionais e não convencionais. Os ésteres etanoato e propanoato de hexadecila demonstraram seletividade para os biodiesel metílicos e etílicos a partir de matérias-primas de oleaginosas e gordura bovina, respectivamente. Também, o butanoato de hexadecila apresentou seletividade para o biodiesel etílico obtido a partir de matéria-prima de gordura bovina. Os três ésteres sintetizados foram purificados com elevado teor de pureza ($\geq 99\%$).

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas do Capítulo I para trabalhos futuros, propõem-se:

- Realizar a identificação molecular do biossurfactante produzido por *A. polymorphus*;
- Avaliar a expressão gênica de *B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e *A. polymorphus*, pela quantificação relativa da expressão dos genes *AlkB* e *Nah* codificadores das enzimas envolvidas na biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos e PAHs;
- Avaliar o sinergismo entre o *B. methylotrophicus*, *P. sihuiensis* e *A. polymorphus*;
- Avaliar a eficiência de biodegradação destes isolados bacterianos como consórcio para biodegradar o petróleo Bazu, óleo diesel, biodiesel de soja e de gordura bovina (B100), assim como as blendas de óleo diesel/biodiesel (B15, B20 e B30).

Como perspectivas do Capítulo II para trabalhos futuros, propõem-se:

- Desenvolver e validar metodologia analítico por GC-FID utilizando o butanoato de hexadecila como padrão interno para biodiesel etílico de gordura bovina, além de biodiesel metílico e etílico a partir de matérias-primas não convencionais;
- Determinar as melhores condições reacionais para se obter o máximo de conversão do reagente limitante (hexadecanol) em ésteres graxos e, assim, otimizar a etapa de purificação e determinar o rendimento na produção destes ésteres graxos sintetizados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASIAN, F.; LOCKINGTON, R.; MEGHARAJ, M. & NAIDU, R. A Review on the Genetics of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbon Degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 178, n. 2, p. 224 - 250, **2016**.
- ADEKUNLE, A. S.; OYEKUNLE, J. A. O.; OBISESAN, O. R.; OJO, O. S. & OJO, O. S. Effects of degumming on biodiesel properties of some non-conventional seed oils. *Energy Reports*, v. 2, p. 188-193, **2016**.
- AFENYO, M.; VEITCH, B. & KHAN, F. A state-of-the-art review of fate and transport of oil spills in open and ice-covered water. *Ocean Engineering*, v. 119, p. 233 - 248, **2016**.
- AFENYO, M.; KHAN, F.; VEITCH, B. & YANG, M. A probabilistic ecological risk model for Arctic marine oil spills. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 5, n. 2, p. 1494 - 1503, **2017**.
- ALEXANDRE, A. C. F.; SILVEIRA, E. V.; CASTRO, C. F. S.; SALES, J. F.; OLIVEIRA, L. C. S.; VIANA, L. H. & BARBOSA, L. C. A. Synthesis, characterization and study of the thermal behavior of methylic and ethylic biodiesel produced from tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mat.) seed oil. *Fuel*, v. 161, p. 233 - 238, **2015**.
- AL-HAWASH, A. B.; DRAGH, M. A.; LI, S.; ALHUJAILY, A.; ABBOOD, H. A.; ZHANG, X. & MA, F. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 44, n. 2, p. 71 - 76, **2018**.
- ALMEDA, R.; WAMBAUGH, Z.; CHAI, C.; WANG, Z.; LIU, Z.; & BUSKEY, E. J. Effects of Crude Oil Exposure on Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Survival of Adult and Larval Stages of Gelatinous Zooplankton. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, p. 1-15, **2013**.
- ALMEIDA, D. G.; SILVA, M. G. C.; BARBOSA, R. N.; SILVA, D. S. P.; SILVA, R. O.; LIMA, G. M. S.; GUSMÃO, N. B & SOUSA, M. F. V. Q. Biodegradation of marine fuel MF-380 by microbial consortium isolated from seawater near the petrochemical Suape Port, Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 116, p. 73 - 82, **2017**.
- ALY SALEM, D. M. S.; MORSY, F. A-E. M.; EL NEMR, A.; EL-SIKAILY, A. & KHALED, A. The monitoring and risk assessment of aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Red Sea, *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 40, n. 4, p. 333 - 348, **2014**.
- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>> **2018**. Acesso em março de **2018**.
- ARULAZHAGAN, P. & VASUDEVAN, N. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, n. 2, p. 388 - 394, **2011**.
- ARULAZHAGAN, P.; VASUDEVAN, N. & YEOM, I. T. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 7, n. 4, p. 639 - 652, **2010**.

- ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; ABDUL AZIZ, A. R. & Sulaiman, N. M. N. Refining technologies for the purification of crude biodiesel. *Energy & Fuels*, v. 88, p. 4239 - 4251, **2011**.
- ATLAS, R. M. & HAZEN, T. C. Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 16, p. 6709 - 6715, **2011**.
- ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 52, p. 149-156, **1991**.
- AYDIN, A. A. & AYDIN, A. High-chain fatty acid esters of 1-hexadecanol for low temperature thermal energy storage with phase change materials. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, v. 96, p. 93 - 100, **2012**.
- BADEJO, A. C.; BADEJO, A. O.; SHIN, K. H. & CHAI, Y. G. A Gene Expression Study of the Activities of Aromatic Ring-Cleavage Dioxygenases in *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK to Changes in Salinity and pH during Pyrene Degradation. *PLOS ONE*, v. 8, n. 2, p. 1 - 8, **2013**.
- BARRON, M. G. Ecological Impacts of the Deepwater Horizon Oil Spill: Implications for Immunotoxicity. *Toxicologic Pathology*, v. 40, n. 2, p. 315 - 320, **2011**.
- BATA, T. P.; LAR, U. A.; SAMAILA, N. K.; DIBAL, H. U.; DASPAN, R. I.; ISAH, L. C.; FUBE, A. A.; IKYOIVE, S. Y.; ELIJAH, E. H. & SHIRPUTDA, J. J. Effect of biodegradation and water washing on oil properties, *AIMS Geosciences*, v. 4, n. 1, p. 21 - 35, **2018**.
- BELO, R. F. C.; FIGUEIREDO, J. P.; NUNES, C. M.; PISSINATTI, R.; DE SOUZA, S. V. C. & JUNQUEIRA, R. G. Accelerated solvent extraction method for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in cocoa beans by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 1053, p. 87 - 100, **2017**.
- BENDINI, A.; CERRETANI, L.; DI VIRGILIO, F.; BELLONI, P.; BONOLI-CARBOGNIN, M. & LERCKER, G. Preliminary evaluation of the application of the FTIR spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils. *Journal of Food Quality*, v. 30, p. 424 - 437, **2007**.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C. & FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 9, p. 1049 - 1055, **2005**.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. & CAMARGO, F. A. O. Biosurfactantes. In: João Lucio Azevedo; Itamar Santos Melo. (Org.). *Microbiologia Ambiental*. 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa, p. 151-184, **2008**.
- BEREKAA, M. M. & STEINBÜCHEL, A. Microbial Degradation of the Multiply Branched Alkane 2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetracosane (Squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 10, p. 4462 - 4467, **2000**.
- BERRIOS, M.; MARTÍN, M. A.; CHICA, A. F. & MARTÍN, A. Purification of biodiesel from used cooking oils. *Applied Energy*, v. 88, p. 3625 - 3631, **2011**.
- BISHT, S.; PANDEY, P.; BHARGAVA, B.; SHARMA, S.; KUMAR, V. & SHARMA, K. D. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 7 - 21, **2015**.

- BOLLMANN, M.; BOSCH, T.; COLIJN, F. World Ocean Review - living with the oceans. Disponível em: <http://aquaticcommons.org/15582/1/WOR1_english.pdf> **2010**. Acesso em maio de **2018**.
- BOUFADEL, M.C.; SHARIFI, Y.; VAN AKEN, B.; WRENN, B. A. & LEE, K. Nutrient and oxygen concentrations within the sediments of an Alaskan beach polluted with the Exxon Valdez oil spill. *Environmental Science & Technology*, v. 44, p. 7418 - 7424, **2010**.
- BUSENELL, L. D. & HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, v. 41, n. 5, p. 653 - 673, **1941**.
- BRADDOCK, J. F. & CATTERALL, P. H. A simple method for enumerating gasoline-and diesel-degrading microorganisms. *Bioremediation Journal*, v. 3, n. 2, p. 81-84, **1999**.
- BRAUN, J. V.; DOS SANTOS, V. O. B.; FONTOURA, L. A. M.; PEREIRA, E.; NAPP, A.; SEFERIN, M.; LIMA, J.; LIGABUE, R. & VAINSTEIN, M. V. GC-FID methodology validation for the fatty esters content determination in biodiesel with hexadecyl acetate as the internal standard. *Química Nova*, v. 40, p. 1111 - 1116, **2017**.
- BRENTON, A. G. & GODFREY, A. R. Accurate mass measurement: terminology and treatment of data. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 21, p. 1821 - 1835, **2010**.
- BS-EN ISO 11358, Thermogravimetry (TG) of Polymers-General Principles, International Organization for Standardization, Switzerland, p. 1 - 10, **1997**.
- BUZETZKI, E.; SIDOROVA, K.; CVENGROSOVA, Z. & CVENGROS, J. Catalytic role of lignocellulosic materials in triacylglycerol cracking. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 92, p. 314 - 323, **2011**.
- CACHET *et al.* Guidelines for the quantitative gas chromatography of volatile flavouring substances, *Flavour and Fragrance Journal*, v. 26, p. 297 - 299, **2011**.
- CAI, W-J.; HUANG, W-J.; LUTHER, G. W.; PIERROT, D. LI, M.; TESTA, J., XUE, M.; JOESOEUF, A.; MANN, R.; BRODEUR, J.; XU, Y-Y.; CHEN, B.; HUSSAIN, N.; WALDBUSSER, G. G.; CORNWELL, J. & KEMP, W. M. Redox reactions and weak buffering capacity lead to acidification in the Chesapeake Bay. *Nature Communications*, v. 8, n. 369, p. 1 - 12, **2017**.
- CANTWELL, S. G.; LAU, E. P.; WATT, D. S. & FALL; R. R. Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology*, v. 135, n. 2, p. 324 - 333, **1978**.
- CARDOSO, A. L.; NEVES, S. C. G. & SILVA, M. J. Esterification of Oleic Acid for Biodiesel Production Catalyzed by SnCl₂: A Kinetic Investigation. *Energies*, v. 1, p. 79 - 92, **2008**.
- CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; CAMARGO, F. A. O.; PERALBA, M. C. R. & BENTO, F. M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 3, p. 1203 - 1222, **2012**.
- CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; VAINSTEIN, M. H.; CAMARGO, F. A. O.; PERALBA, M. C. R. & BENTO, F. M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 23, p. 11003 - 11010, **2011**.

- CIPOLLA, A.; DELBRASSINE, F.; DA LAGE, J.-L. & FELLER, G. Temperature adaptations in psychrophilic, mesophilic and thermophilic chloride-dependent alpha-amylases. *Biochimie*, v. 94, n. 9, p. 1943 - 1950, **2012**.
- CHEN, C. Y.; NACE, G. W. & IRWIN, P. L. A 6×6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 55, n. 2, p. 475 - 479, **2003**.
- CHEN, J.; ZHANG, W.; LI, S.; ZHANG, F.; ZHU, Y. & HUANG, X. Identifying critical factors of oil spill in the tanker shipping industry worldwide. *Journal of Cleaner Production*, v. 180, p. 1 - 10, **2018**.
- CHEN, W.; LI, J.; SUN, X.; MIN, J. & HU, X. High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 118, p. 110 - 18, **2017**.
- COLLA, T.; ANDREAZZA, R.; BÜCKER, F.; DE SOUZA, M.; TRAMONTINI, L.; PRADO, G.; FRAZZON, A.; CAMARGO, F. & BENTO, F. M. Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 4, p. 2592 - 2602, **2014**.
- COOPER, D. G. & GOLDENBERG, B. G. Surface-active Agents from Two *Bacillus* species, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224 - 229, **1987**.
- CRUZ, L. S.; LIMA, R. Z.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D. & PINTO, L. M. A. Physical and chemical characterization of fractions of fruit atemoya Gefner. *Ciência Rural*, v. 43, n. 12, p. 2280 - 2284, **2013**.
- CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E. M. & BOSQUE-SENDRA, J. M. Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 20, p. 620 - 636, **2001**.
- CUCU, T. & DE MEULENAER, B. Development of a quantitative GC-FID method for the determination of sucrose mono- and diesters in foods. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 32, n. 9, 1406 - 1415, **2015**.
- DA CRUZ, L. S.; ARAÚJO, B. L. O.; ALBUQUERQUE, L. R. M.; NETO, P. C.; CORRÊA, A. D. & PINTO, L. Characterization of biodiesel obtained from atemoya (*Annona squamosa* A. *cherimola*) seed oil. *African Journal of Biotechnology*, v. 17, n. 7, p. 226 - 231, **2018**.
- DAS, N. & CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, v. 2011, p. 1 - 13, **2011**.
- DELLAGNEZZE, B. M.; DE SOUSA, G. V.; MARTINS, L. L.; DOMINGOS, D. F.; LIMACHE, E. E.; G.; DE VASCONCELLOS, S. P.; DA CRUZ, G. F. & DE OLIVEIRA, V. M. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. *Marine Pollution Bulletin*, v. 89, n. 2, p. 191-200, **2014**.
- DENG, M. C.; LI, J.; LIANG, F. R.; YI, M.; XU, X. M.; YUAN, J. P.; PENG, J. & WU, C. F.; WANG, J. H. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. *Marine Pollution Bulletin*, 83, n. p. 79 - 86, **2014**.
- DING, J.; XIA, Z. & LU, J. Esterification and Deacidification of a Waste Cooking Oil (TAN 68.81 mg KOH/g) for Biodiesel Production. *Energies*, v. 5, p. 2683 - 2691, **2012**.
- DÖRR DE QUADROS, P.; CERQUEIRA, V. S.; CAZAROLLI, J. C.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. O., GIONGO, A. & BENTO, M., F. Oily sludge stimulates

- microbial activity and changes microbial structure in a landfarming soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 115, p. 90 - 101, **2016**.
- DOS SANTOS, F. H.; DUARTE, G. A. S.; RACHID, C. T. DA C.; CHALOUB, R. M.; CALDERON, E. N.; MARANGONI, L. F. DE B.; BIANCHINI, A.; NUDI, A. H.; DO CARMO, F. L.; VAN ELSAS, J. D.; ROSADO, A. S.; E CASTRO, C. B. & PEIXOTO, R. S. Impact of oil spills on coral reefs can be reduced by bioremediation using probiotic microbiota. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 1-11, **2015**.
- EBADI, A.; KHOSHKHOLGH SIMA, N. A.; OLAMAE, M.; HASHEMI, M. & GHORBANI, N. R. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Journal of Advanced Research*, v. 8, n. 6, p. 627 - 633, **2017**.
- EGLESTON, E. S.; SABINE, C. L. & MOREL, F. M. M. Revelle revisited: Buffer factors that quantify the response of ocean chemistry to changes in DIC and alkalinity. *Global Biogeochemical Cycles*, v. 24, n. 1, p. 1 - 9, **2010**.
- EN 14103:2003; Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. European Committee for Standardization: Brussels, **2003**.
- EN 14103:2011; Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. European Committee for Standardization: Brussels, **2011**.
- EN 14214:2008; Automotive fuels - Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines - Requirements and test methods. European Committee for Standardization: Brussels, **2008**.
- ETNOYER, P. J.; WICKES, L. N.; SILVA, M.; DUBICK, J. D.; BALTHIS, L.; SALGADO, E. & MACDONALD, I. R. Decline in condition of gorgonian octocorals on mesophotic reefs in the northern Gulf of Mexico: before and after the Deepwater Horizon oil spill. *Coral Reefs*, v. 35, n. 1, p. 77 - 90, **2015**.
- FAN, A. Z.; PRESCOTT, M. R.; ZHAO, G.; GOTWAY, C. A. & GALEA, S. Individual and community-level determinants of mental and physical health after the Deepwater Horizon oil spill: Findings from the Gulf States Population Survey. *Journal of Behavioral Health Services and Research*, v. 42, n. 1, p. 23 - 41, **2015**.
- FEDERAL REGISTER - O Gabinete do Registro Federal, Arquivos Nacionais e Administração de Registros, Washington DC, vol. 80, No. 239, 14 de dezembro de 2015: Disponível em: <<https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2015-12-14>>. **2015**. Acesso em outubro de **2018**.
- FERREIRA, V. R.; GOUVEIA, C. D.; SILVA, C. A.; FERNANDES, A. N. & GRASSI, M. T. Optimization of an Analytical Protocol for the Extraction, Fractionation and Determination of Aromatic and Aliphatic Hydrocarbons in Sediments. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. 8, p. 1460 - 1468, **2012**.
- FISHER, C.; MONTAGNA, P. & SUTTON, T. How Did the Deepwater Horizon Oil Spill Impact Deep-Sea Ecosystems? *Oceanography*, v. 29, n. 3, p. 182–195, **2016**.
- FISHER, C. R.; HSING, P.-Y.; KAISER, C. L.; YOERGER, D. R.; ROBERTS, H. H.; SHEDD, W. W.; CORDES, E. E.; SHANK, T. M.; BERLET, S. P.; SAUNDERS, M. G.; LARCOM, E. A. & BROOK, J. M. Footprint of Deepwater Horizon blowout impact to deep-water coral communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 32, p. 11744–11749, **2014**.
- FORFANG, K.; ZIMMERMANN, B.; KOSA, G.; KOHLER, A. & SHAPAVAL, V. FTIR Spectroscopy for Evaluation and Monitoring of Lipid Extraction Efficiency for Oleaginous Fungi. *PLOS ONE*, v. 24, p. 1 - 17, **2017**.

- FUCHS, G.; BOLL, M. & HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds – from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 11, p. 803 - 816, **2011**.
- FRITSCHÉ, W. & HOFRICHTER, M. Aerobic degradation by microorganisms. Environmental Process, Chapter 6. Biotechnology: Environmental Processes II, **2008**. doi: 10.1002/9783527620951.ch6.
- GALFORD, G. L.; FERNANDEZ, M.; ROMAN, J.; MONASTEROLO, I.; AHAMED, S.; FISKE, G.; GONZÁLEZ-DÍAZ, P. & KAUFMAN, L. Cuban land use and conservation, from rainforests to coral reefs. *Bulletin of Marine Science*, v. 94, n. 2, p. 171–191, **2018**.
- GARRITY, G.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R. & STALEY, J. T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second ed. Springer-Verlag, New York. **2005**.
- GE, B.; LIU, B.; NWET, T. T.; ZHAO, W.; SHI, L. & ZHANG, K. *Bacillus methylotrophicus* Strain NKG-1, Isolated from Changbai Mountain, China, Has Potential Applications as a Biofertilizer or Biocontrol Agent. *PLOS ONE*, v. 11, n. 11, p. 1 - 13, **2016**.
- GEETHA, S.J.; BANAT, I. M. & JOSHI, S. J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 14, p. 23 - 32, **2018**.
- GEISLER, M.; OELLIG, C.; MOSS, K.; SCHWACK, W.; HENKEL, M. & HAUSMANN, R. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) for the simultaneous quantification of the cyclic lipopeptides Surfactin, Iturin A and Fengycin in culture samples of *Bacillus* species. *Journal of Chromatography B*, v. 1044, p. 214 - 224, **2017**.
- GIARDINA, M. & MCCURRY, J. D. Comparison of Temperature Programmable Split/Splitless and Cool On-Column Inlets for the Determination of Glycerol and Glycerides in Biodiesel by Gas Chromatography with Flame Ionization Detection. *Journal of Chromatographic Science*, v. 54, p. 683 - 688, **2016**.
- GOULD, D. W.; TEICH, J. L.; PEMBERTON, M. R.; PIERANNUNZI, C. & LARSON, S. Behavioral health in Gulf Coast Region following the Deepwater Horizon oil spill: Findings from two federal surveys. *Journal of Behavioral Health Services and Research*, v. 42, n. 1, p. 6-22, **2015**.
- GRIFFITHS, S. K. Oil Release from Macondo Well MC252 Following the Deepwater Horizon Accident. *Environmental Science & Technology*, v. 46, n. 10, p. 5616 - 5622, **2012**.
- HAMED, S. B.; REZGUI, R.; HALLEB, A.; GHRAM, A.; OUESLATTI, R.; LABAT, M. & MAAROUFI, A. Efficiency of refinery sludge biodegradation using municipal wastewater and activated sludge and effect of hydrocarbon concentration on culturable bacteria community. *Annals of Microbiology*, v. 60, n. 4. p. 747 - 755, **2010**.
- HAN, Y.; NAMBI, I. M. & PRABHAKAR, C. T. Environmental impacts of the Chennai oil spill accident – A case study. *Science of The Total Environment*, v. 626, p. 795 - 806, **2018**.
- HANSEL, T. C.; OSOFSKY, H. J.; OSOFSKY, J. D. & SPEIER, A. Longer-term mental and behavioral health effects of the Deepwater Horizon Gulf oil spill. *Journal of Marine Science and Engineering*, v. 3, n. 4, p. 1260-1271, **2015**.
- HEIN, C. Oil Spaces: The Global Petroleumscape in the Rotterdam/The Hague Area. *Journal of Urban History*, v. 44, n. 5, p. 887 - 929, **2018**.

- HEJAZI, L.; EBRAHIMI, D.; GUILHAUS, M. & HIBBERT, D. B. Determination of the Composition of Fatty Acid Mixtures Using GC × FI-MS: A Comprehensive Two-Dimensional Separation Approach. *Analytical Chemistry*, v. 81, p. 1450 - 1458, **2009**.
- HERZFELDER, E. R. & GOLLEDGE, R. W. Method for the determination of extractable petroleum hydrocarbons (EPH). Massachusetts Department of Environmental Protection, Boston. p. 19, 37 - 40, **2004**.
- HU, S.; LI, S.; WANG, J. & CAO, J. Origin of unresolved complex mixtures (UCMs) in biodegraded oils: Insights from artificial biodegradation experiments. *Fuel*, v. 231, p. 53 - 60, **2018**.
- ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Geneva, Switzerland, **2005**.
- IEA - International Energy Agency. **Analysis and Forecasts to 2023**. (<https://www.iea.org/Textbase/npsum/oil2018MRSsum.pdf>). Acesso em: 23 de agosto de **2018**.
- IOFI - Working Group on Methods of Analysis. Guidelines for the quantitative gas chromatography of volatile flavouring substances, from the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavor Industry, *Flavour and Fragrance Journal*, v. 26, p. 297 - 299, **2011**.
- ISSARIYAKUL, T.; KULKARNI, M. G.; DALAI, A. K. & BAKHSHI, N. N. Production of biodiesel from waste fryer grease using mixed methanol/ethanol system. *Fuel Processing Technology*, v. 88, p. 429 - 436, **2007**.
- I TOPF - International Tanker Owners Pollution Federation. Oil tanker spill statistics. (http://www.itopf.org/fileadmin/data/Photos/Statistics/Oil_Spill_Stats_2017_web.pdf). **2017**. Acessado em: 25 de março de 2018.
- JACQUES, R. J. S.; OKEKE, B. C.; BENTO, F. M.; PERALBA, M. C. R. & CAMARGO, F. A. O. Characterization of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Microbial Consortium from a Petrochemical Sludge Landfarming Site. *Bioremediation Journal*, v. 11, n. 1, p. 1 - 11, **2007**.
- JAYANTHI, R. & HEMASHENPAGAM, N. Optimization of BH medium for efficient Biodegradation of Benzene, Toluene and Xylene by a *Bacillus cereus*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 4, p. 807 - 815, **2015**.
- JEMIL, N.; MANRESA, A.; RABANAL, F.; AYED, H. B.; HMIDET, N. & NASRI, M. Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. *Journal of Chromatography B*, v. 1060, p. 374 - 386, **2017**.
- JERNELÖV, A. The Threats from Oil Spills: Now, Then, and in the Future. *Ambio*, v. 39, n. 5, p. 353 - 366, **2010**.
- JOUANNEAU, Y.; MEYER, C. & DURAFFOURG, N. Dihydroxylation of four- and five-ring aromatic hydrocarbons by the naphthalene dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 3, p. 1253 - 1263, **2016**.
- JURY, C. P.; THOMAS, F. I. M.; ATKINSON, M. J. & TOONEN, R. J. Buffer Capacity, Ecosystem Feedbacks, and Seawater Chemistry under Global Change. *Water*, v. 5, n. 3, p. 1303 - 1325, **2013**.
- KANALY, R. A. & HARAYAMA, S. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 8, p. 2059 - 2067, **2000**.

- KDHE - Kansas Department of Health and Environment. KANSAS METHOD FOR THE DETERMINATION OF MID-RANGE HYDROCARBONS (MRH) AND HIGH-RANGE HYDROCARBONS (HRH), p. 1 – 27. Disponível em: <http://www.kdheks.gov/envlab/download/KS_MRH_&_HRH_Method-Final.pdf> **2015**. Acesso em agosto de 2018.
- KIM, J. B. & BLACKSHAW, S. One-step enzymatic purification of PCR products for direct sequencing. *Current Protocols in Human Genetics*, **2001**. doi: 10.1002/0471142905.hg1106s30.
- KIYOHARA, H.; NAGAO, K. & YANA, K. Rapid screen for bacteria degrading waterinsoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 454 - 457, **1982**.
- KHOURY, R. R.; EBRAHIMI, D.; HEJAZI, L.; BUCKNALL, M. P.; PICKFORD, R. & BRYNN, H. D. Degradation of fatty acid methyl esters in biodiesels exposed to sunlight and seawater. *Fuel*, v. 90, n. 8, p. 2677 - 2683, **2011**.
- KOOLIVAND, A.; RAJAEI, M. S.; GHANADZADEH, M. J.; SAEEDI, R. ; ABTAHI, H. & GODINI, K. Bioremediation of storage tank bottom sludge by using a two-stage composting system: Effect of mixing ratio and nutrients addition. *Bioresource Technology*, v. 235, 240 - 249, **2017**.
- KOTZAKOULAKIS, K. & GEORGE, S. C. Predicting the weathering of fuel and oil spills: A diffusion-limited evaporation model. *Chemosphere*, v. 190, p. 442 - 453, **2018**.
- KUNIHITO, N.; HARUKI, M.; TAKANO, K.; MORIKAWA, M. & KANAYA, S. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. strains TMP2 and T12 that degrade 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane) at moderately low temperatures. *Journal of Biotechnology*, v. 115, n. 129 - 136, **2005**.
- LAMERS, P.; MCCORMICK, K. & HILBERT, J. The emerging liquid biofuel market in Argentina: Implications for domestic demand and international trade. *Energy Policy*, v. 36, p. 1479 – 1490, **2008**.
- LANG, E.; SWIDERSKI, J.; STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P.; SPRÖER, C. & SAHIN, N. Description of *Ancylobacter oerskovii* sp. nov. and two additional strains of *Ancylobacter polymorphus*. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, n. 9, p. 1997- 2002, **2008**.
- LEVI, P. G. & CULLEN, J. M. Mapping Global Flows of Chemicals: From Fossil Fuel Feedstocks to Chemical Products. *Environmental Science & Technology*, v. 52, n. 4, p. 1725 - 1734, **2018**.
- LI, S.; CAO, J.; HU, S.; & LUO, G. Characterization of compounds in unresolved complex mixtures (UCM) of a Mesoproterozoic shale by using GC×GC-TOFMS. *Marine and Petroleum Geology*, v. 66, p. 791 - 800, **2015**.
- LIAO, J. H.; CHEN, P. Y.; YANG, Y. L.; KAN, S. C.; HSIEH, F. C. & LIU, Y. C. Clarification of the antagonistic effect of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 against *Pyricularia oryzae* via in situ MALDI-TOF IMS Analysis. *Molecules*, v. 21, n. 12, p. 1 - 11, **2016**.
- LIU, C. W.; CHANG, W. N. & LIU, H. S. Bioremediation of n-alkanes and the formation of bioflocules by *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 under various saline conditions and sea water. *Biochemical Engineering Journal*, v. 45, n. 1, p. 69 - 75, **2009**.
- LIU, Q.; TANG, J.; BAI, Z.; HECKER, M. & GIESY, J. P. Distribution of petroleum degrading genes and factor analysis of petroleum contaminated soil from the Dagang Oilfield, China. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 1 - 12, **2015**.

- MAHJOUBI, M.; CAPPELLO, S.; SOUISSI, Y.; JAOUANI, A. & CHERIF, A. Microbial Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon- Contaminated Marine Environments. Chapter 16. *Recent Insights in Petroleum Science and Engineering*, p. 325 - 350, **2018**.
- MAIER, R. M. & GENTRY, T. T. 2015. Microorganisms and Organic Pollutants. Chapter 17. *Environmental Microbiology*, 3 edition, p. 377 - 413, **2015**.
- MARDANI, G.; MAHVI, A. H.; HASHEMZADEH-CHALESHTORI, M.; NASERI, S.; DEGHANI, M. H. & GHASEMI-DEHKORDI, P. Application of Genetically Engineered Dioxygenase Producing *Pseudomonas putida* on Decomposition of Oil from Spiked Soil. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, v. 12, n. 3, p. e64313, **2017**.
- MARGESIN, R. Effect of temperature on growth parameters of psychrophilic bacteria and yeasts. *Extremophiles*, v. 13, n. 2, p. 257 - 262, **2008**.
- MARQUES, M. V.; NACIUK, F. F.; MELLO, A. M. S.; SEIBEL, N. M. & FONTOURA, L. A. M. Determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel metílico de soja por cromatografia gasosa utilizando oleato de etila como padrão interno. *Química Nova*, v. 33, p. 978 - 980, **2010**.
- MESQUITA, N. C. M. R.; DYSZY, F. H.; KUMAGAI, P. S.; ARAÚJO, A. P. U. & COSTA-FILHO, A. J. Amphipatic molecules affect the kinetic profile of *Pseudomonas putida* chlorocatechol 1,2-dioxygenase. *European Biophysics Journal*, v. 42, n. 8, p. 655 - 60, **2013**.
- MEYER, D. D.; BEKER, S. A.; BÜCKER, F.; PERALBA, M. C. R.; FRAZZON, A. P. G.; OSTI, J. F.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O. & BENTO, F. M. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 95, p. 356 - 363, **2014**.
- MAYER, B.; RUNNING, K. & BERGSTRAND, K. Compensation and community corrosion: Perceived inequalities, social comparisons, and competition following the Deepwater Horizon oil spill. *Sociological Forum*, v. 30, n. 2, p. 369-390, **2015**.
- McFARLIN, K. M.; PRINCE, R. C.; PERKINS, R. & LEIGH, M. B. Biodegradation of Dispersed Oil in Arctic Seawater at -1 °C. *PLOS ONE*, v. 9, n. 1, p. 1 - 8, **2014**.
- McFARLIN, K. M.; PERKINS, M. J.; FIELD, J. A. & LEIGH, M. B. Biodegradation of Crude Oil and Corexit 9500 in Arctic Seawater. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1 - 14, **2018**.
- MEARNS, A. J.; REISH, D. J.; OSHIDA, P. S.; MORRISON, A. M.; REMPEL-HESTER, M. A.; ARTHUR, C.; RUTHERFORD, N. & PRYOR, R. Effects of Pollution on Marine Organisms. *Water Environment Research*, v. 89, n. 10, p. 1704 - 1798, **2017**.
- MERCHANT, S. S. & HELMANN, J. D. Elemental Economy: microbial strategies for optimizing growth in the face of nutrient limitation. *Advances in Microbial Physiology*, v. 60, p. 91 - 210, **2012**.
- MICHEL, J. & FINGAS, M. Oil Spills: Causes, Consequences, Prevention, and Countermeasures. *Fossil Fuels*, p. 159 - 201, **2016**.
- MIRGHANI, M. A.; KABBASHI, N. A.; ALAM, M. .; QUDSIEH, I. Y. & ALKATIB, M. F. R. Rapid Method for the Determination of Moisture Content in Biodiesel Using FTIR Spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 88, p. 1897 - 1904, **2011**.
- MOLINA, M. C.; GONZÁLEZ, N.; BAUTISTA, L. F.; SANZ, R.; SIMARRO, R.; SÁNCHEZ, I. & SANZ, J. L. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation*, v. 20, n. 6, p. 789 - 800, **2009**.

- MONTEIRO, A. S.; BONFIM, M. R. Q.; DOMINGUES, V. S.; CORRÊA JR. A. SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L. & SANTOS, V. L. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 14, p. 5186 - 5193, **2010**.
- MORAES, M. S. A.; KRAUSE, L. C.; CUNHA, M. E.; FACCINI, C. S.; MENEZES, E. W.; VESES, C. V.; RODRIGUES, M. R. A. & CARAMÃO, E. B. Tallow Biodiesel: Properties Evaluation and Consumption Tests in a Diesel Engine. *Energy Fuels*, v. 22, p. 1949 - 1954, **2008**.
- MORGAN, J. D. The Oil Pollution Act of 1990: A Look at its Impact on the Oil Industry. *Fordham Environmental Law Review*, v. 6, n. 1, 1-27, **1994**.
- MORRIS, J. G.; GRATTAN, L. M.; MAYER, B. M. & BLACKBURN, J. K. Psychological responses and resilience of people and communities impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, v. 124, 191-201, **2013**.
- MORO, G. V.; ALMEIDA, R. T. R.; NAPP, A. P.; PORTO, C.; PILAU, E. J.; LÜDTKE, D. S.; MORO A. V. & VAINSTEIN, M. H. Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments. *Microbial Biotechnology*, v. 11, n. 4, p. 759 - 769, **2018**.
- MOHAMED, M.; AL-DOUSARY, M.; HAMZAH, R. & FUCHS, G. Isolation and characterization of indigenous thermophilic bacteria active in natural attenuation of bio-hazardous petrochemical pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 58, n. 3, p. 213-223, **2006**.
- MULET, M.; GOMILA, M.; LEMAITRE, B.; LALUCAT, J. & GARCÍA-VALDÉS, E. Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 35, n. 3, p. 145 - 149, **2012**.
- NAGHILI, H.; TAJIK, H.; MARDANI, K.; RAZAVI, R. S. M.; EHSANI, A. & ZARE, P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary Research Forum*, v. 4, n. 3, p. 79 - 83, **2013**.
- NASA - National Aeronautics and Space Administration. *Sea Surface Temperature*. Disponível em: <<https://earthobservatory.nasa.gov/global-maps/MYD28M>> **2018**. Acesso em outubro de 2018.
- NARDELI, S. M.; SAAD, C. F.; ROSSETTO, P. DE B.; CAETANO, V. S.; RIBEIRO-ALVES, M.; PAES, J. E. S.; DANIELOWSKI, R.; DA MAIA, L. C.; DE OLIVEIRA, A. C.; PEIXOTO, R.S.; REINERT, F. & ALVES-FERREIRA, M. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to oil contamination. *Environmental and Experimental Botany*, 127, 63 - 72, **2016**.
- NASSERI, S.; KALANTARY, R. R.; NOURIEH, N.; NADDAFI, K.; MAHVI, A. H. & BARADARAN, N. Influence of bioaugmentation in biodegradation of PHAs-contaminated soil in bio-slurry phase reactor. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, v. 7, n. 3, p. 199 - 208, **2010**.
- NAYARISSERI, A.; SINGH, P. & SINGH, S. K. Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus subtilis* strain ANSKLAB03. *Bioinformation*, v. 14, n. 6, p. 304 - 314, **2018**.

- NBR 15764:2009. Brazilian Association of Technical Rules. Disponível em: <http://www.abnt.org.br/imagens/normalizacao_homologacao/lista_de_publicacao_-_2009.10.06_a_2009.10.30.pdf> **2009**. Acesso em janeiro de 2018.
- NIE, H.; NIE, M.; XIAO, T.; WANG, Y. & TIAN, X. Hexadecane degradation of *Pseudomonas aeruginosa* NY3 promoted by glutaric acid. *Science of The Total Environment*, v. 575, p. 1423 -1428, **2017**.
- NOAA - Ocean Service Education. Corals: Importance of coral reefs. Disponível em: <http://oceanservice.noaa.gov/education/kits/corals/coral07_importance.html>. **2001**. Acessado em 23 de agosto de 2018.
- ODEN, K. Analysis of FAMES in Biodiesel Fuel: Pro EZGC Modeling Software Ensures Proper Column Selection. *Pure Chromatography*. Disponível em: <<http://www.restek.com/pdfs/PCAN2889-UNV.pdf>> **2018**. Acesso em agosto de 2018.
- OSOFSKY, H. J.; HANSEL, T. C.; OSOFSKY, J. D. & SPEIER, A. Factors contributing to mental and physical health care in a disaster-prone environment. *Behavioral Medicine*, p. 131-137, **2015**.
- OPPERHULZEN, A.; VOLDE, E. W. V. D.; GOBAS, F. A. P. C.; LIEM, D. A. K.; STEEN, J. M. D. V. D. & HUTZINGER, O. Relationship between bioconcentration in fish and steric factors of hydrophobic chemicals. *Chemosphere*, v. 14, n. 11-12, p. 1871 - 1896, **1985**.
- PALIWAL, V.; PURANIK, S. & PUROHIT, H. J. Integrated Perspective for Effective Bioremediation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, n. 4, p. 903 - 924, **2012**.
- PANIAGUA-MICHEL, J. & ROSALES, A. Marine Bioremediation - A Sustainable Biotechnology of Petroleum Hydrocarbons Biodegradation in Coastal and Marine Environments. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, v. 6, n. 2, p. 1 - 6, **2015**.
- PATOWARY, R.; PATOWARY, K.; KALITA, M. C. & DEKA, S. Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 129, p. 50 - 60, **2018**.
- PAUDYN, K.; RUTTER, A.; ROWE, R. K. & POLAND, J. S. Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by Landfarming. *Cold Regions Science and Technology*, v. 53, p. 102 - 114, **2008**.
- PAWLOWICZ, R.; FEISTEL, R.; MCDOUGALL, T. J.; RIDOUT, P.; SEITZ, S. & WOLF, H. Metrological challenges for measurements of key climatological observables – Part 2: Oceanic salinity, *BIPM & IOP Publishing Ltd Metrologia*, v. 53, n. 1, p. 12 - 25, **2015**.
- PENG, R.; SHI, B.; FU, X.; TIAN, Y.; ZHAO, W.; ZHU, B.; XU, J.; HAN, H.; YUAN, Z.; LIU, K. & YAO, Q. Improving rice ability to degrade different polycyclic aromatic hydrocarbons through multigene transformation of a hybrid dioxygenase system. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 33, n. 4, p. 1030 - 1041, **2015**.
- PETERSON, C. H.; RICE, S. D.; SHORT, J. W.; ESLER, D.; BODKIN, J. L.; BALLACHEY, B. E. & IRONS, D. B. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science*, v. 302, p. 2082 - 2086, **2003**.
- PITTER P. & CHUDоба J. Biodegradability of Organic Substances in the Aquatic Environment. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. **1990**.
- PUGAZHENDI, A.; QARI, H.; BASAHI, J. M. A.; GODON, J. J. & DHAVAMANI, J. Role of a halothermophilic bacterial consortium for the biodegradation of PAHs and the

- treatment of petroleum wastewater at extreme condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 121, p. 44 - 54, 2017.
- RAHMAN, P. K. S. M.; PASIRAYI, G.; AUGER, V. & ALI, Z. Production of rhamnolipid Biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 in a microfluidic bioreactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 55, n. 1, p. 45 - 52, 2010.
- RENGARAJAN, T.; RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; LOKESHKUMAR, B.; RAJENDRAN, P. & NISHIGAKI, I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 5, n. 3, 182 -189, 2015.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771 - 780, 2004.
- RICHARDA, J. Y. & VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 44, n. 2, p. 93 - 100, 1999.
- ROCHA, C. A.; PEDREGOSA, A. M. & LABORDA, F. Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. *AMB Express*, v. 1, n. 1, p. 1 - 9, 2011.
- ROHMAN, A. & MAN, Y. B. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. *Food Research international*, v. 43, p. 886 - 892, 2010.
- ROSENBERG, L. & LIGENZA, L. The Deepwater Horizon Oil Spill and Ongoing Mental Health Impact. *The Journal of Behavioral Health Services & Research*, v. 42, n. 1, p. 1 - 2, 2015
- ROY, A.; DUTTA, A.; PAL, S.; GUPTA, A.; SARKAR, J.; CHATTERJEE, A.; SAHA, A.; SARKAR, P.; SAR, P. & KAZY, S. K. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresource Technology*, v. 253, p. 22 - 32, 2018.
- RUSHDI, R. T.; RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; LOKESHKUMAR, B.; RAJENDRAN, P. & NISHIGAKI, I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 5, n. 3, 182–189, 2015.
- SAADOUN, I. M. K. Impact of Oil Spills on Marine Life. Chapter 4. Emerging Pollutants in the Environment - Current and Further Implications. 2015.
- SAADOUN, I. M. K. & AL-GHZAWI, Z. D. Bioremediation of aquatic and terrestrial ecosystems. in Bioremediation of petroleum contamination, Page 174 - 212, M. Fingerman and R. Nagabhushanam, eds., Enfield, New Hampshire, U.K. 2005.
- SALIMON, J.; NALLATHAMBY, N.; SALIH, N. & ABDULLAH, B. M. Synthesis and Physical Properties of Estolide Ester Using Saturated Fatty Acid and Ricinoleic Acid. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, v. 2011, p. 1 - 4, 2011.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- SARWAR, A.; HASSAN, M. N.; IMRAN, M., IQBAL, M.; MAJEED, S.; BRADER, G.; SESSITSCH, A. & HAFEEZ, F, Y. Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. *Microbiological Research*, v. 209, p. 1 - 13, 2018.

- SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M. & CHOPADEV, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 30, n. 2, p. 127 - 144, **2010**.
- SCHAEFFER, T. L.; CANTWELL, S. G.; BROWN, J. L.; WATT, D. S. & FALL, R. R. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 38, n. 4, p. 742 - 746, **1979**.
- SCHOBBER, S.; SEIDL, I. & MITTELBAACH, M. Ester content evaluation in biodiesel from animal fats and lauric oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 108, p. 309 - 314, **2006**.
- SHAO, B.; LIU, Z.; ZHONG, H.; ZENG, G.; LIU, G.; YU, M.; LIU, Y.; YANG, X.; LI, L.; FANG, Z.; ZHANG, J. & ZHAO, C. Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review. *Microbiological Research*, v. 200, p. 33 - 44, **2017**.
- SHAPIRO A. Reform predictive policing. *Nature*, v. 541, n. 7638, p. 458 - 460, **2017**.
- SHEPPARD, P. J.; SIMONS, K. L.; ADETUTU, E. M.; KADALI, K. K.; JUHASZ, A. L.; MANEFIELD, M.; SARMA, P. M.; LAL, B. & BALL, A. S. The application of a carrier-based bioremediation strategy for marine oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, v. 84, n. 2, p. 339 - 346, **2014**.
- SHULTZ, J. M. & NERIA, Y. Trauma signature analysis: State of the art and evolving future directions. *Disaster Health*, v. 1, n. 1, p. 4-7, **2013**.
- SIEGMUND, I. & WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, v. 5, n. 4, p. 265 - 268, **1991**.
- SILVA, R. A.; GROSSI, V. & ALVAREZ, H. M. Biodegradation of phytane (2,6,10,14-tetramethylhexadecane) and accumulation of related isoprenoid wax esters by *Mycobacterium ratisbonense* strain SD4 under nitrogen-starved conditions. *FEMS Microbiology Letters*, v. 272, n. 2, p. 220 - 228, **2007**.
- SILVA, M.; ETNOYER, P. J. & MACDONALD, I. R. Coral injuries observed at Mesophotic Reefs after the Deepwater Horizon oil discharge. Deep Sea Research Part II: *Topical Studies in Oceanography*, v. 129, p. 96–107, **2016**.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. & KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 7 ed. Editora LTC, Rio de Janeiro, **2007**.
- SIMPSON, A. C. The Torrey Canyon Disaster and fisheries. Laboratory Leaflet n. 18, p. 43. Essex, UK: Fisheries Laboratory, Burnham on Crouch. **1968**.
- SINANOGLOU, V. J.; STRATI, I. F.; BRATAKOS, S. M.; PROESTOS, C.; ZOUMPOULAKIS, P. & MINIADIS-MEIMAROGLOU, S. On the Combined Application of Iatroskan TLC-FID and GC-FID to Identify Total, Neutral, and Polar Lipids and Their Fatty Acids Extracted from Foods. *ISRN Chromatography*, **2013**, doi: 10.1155/2013/859024.
- SINGLETON, D. R.; GUZMAN RAMIREZ, L. & AITKEN, M. D. Characterization of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation Gene Cluster in a Phenanthrene-Degrading Acidovorax Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 9, p. 2613 - 2620, **2009**.
- SITEPU, I. R.; GARAY, L. A.; SESTRIC, R.; LEVIN, D.; BLOCK, D. E.; GERMAN, J. B. & BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, v. 32, n. 7, p. 1336 - 1360, **2014**.

- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. & CROUCH, S. R. Principles of Instrumental Analysis, 6th ed. Thomson Brooks/Cole, Stamford, **2007**.
- SHORT, J. W.; IRVINE, G. V.; MANN, D. H.; MASELKO, J. M.; PELLA, J. J.; LINDEBERG, M. R.; PAYNE, J. R.; DRISKELL, W. B. & RICE, S. D. Slightly weathered Exxon Valdez oil persists in Gulf of Alaska beach sediments after 16 years. *Environmental Science & Technology*, v. 41, p. 1245 - 1250, **2007**.
- SOUZA F. A. S. D.; SALGUEIRO A. A. & ALBUQUERQUE, C. D. C. Production of bioemulsifier by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 29, n. 1, p. 61 - 67, **2012**.
- SOUZA, E. C.; VESSONI-PENNA, T. C.; ARNI, S. A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; CONVERTI, A. & OLIVEIRA, R. P. DE S. Influence of toluene and salinity on biosurfactant production by *Bacillus* sp.: scale up from flasks to a bench-scale bioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 34, n. 2, p. 395 – 405, **2017**.
- SWAATHY, S.; KAVITHA, V.; PRAVIN, A. S.; MANDAL, A. B. & GNANAMANI, A. Microbial surfactant mediated degradation of anthracene in aqueous phase by marine *Bacillus licheniformis* MTCC 5514. *Biotechnology Reports*, v. 4, p. 161 - 170, **2014**.
- TANG, K. H. D.; MD DAWAL, S. Z. & OLUGU, E. U. A review of the offshore oil and gas safety indices. *Safety Science*, v. 109, p. 344 - 352, **2018**.
- TEIR, S.; KUUSIK, R.; FOGELHOLM, C-J. & ZEVENHOVEN, R. Production of magnesium carbonates from serpentinite for long-term storage of CO₂. *International Journal of Mineral Processing*, v. 85, n. 3, p. 1 - 15. **2007**.
- TIETZE, L. F. & EICHER, T. Reactions and Syntheses in the Organic Chemistry Laboratory, in: University Science Books, Mill Valley, p. 169 - 193, **1989**.
- TKAVC, R.; MATROSOVA, V. Y.; GRICHENKO, O. E.; GOSTINČAR, C.; VOLPE, R. P.; KLIMENKOVA, P.; GAIDAMAKOVA, E. K.; ZHOU, C. E.; STEWART, B. J.; LYMAN, M. G.; MALFATTI, S. A.; RUBINFELD, B.; COURTOT, M.; SINGH, J.; DALGARD, C. L.; HAMILTON, T.; FREY, K. G.; GUNDE-CIMERMAN, N.; DUGAN, L. & DALY, M.J. Prospects for Fungal Bioremediation of Acidic Radioactive Waste Sites: Characterization and Genome Sequence of *Rhodotorula taiwanensis* MD1149. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1 - 21, **2018**.
- TOJU, H.; TANABE, A. S.; YAMAMOTO, S. & SATO, H. High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *Plos One*, v. 7, p. 1 - 11, **2012**.
- TOLEDO, F. L.; CALVO, C.; RODELAS, B. & GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 29, n. 3, p. 244 - 252, **2006**.
- TURNER, N. R. & RENEGAR, D. A. Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. *Marine Pollution Bulletin*, v. 119, n. 2, 1 - 16, **2017**.
- TROFA, D.; GA'CSER, A.; NOSANCHUK, F. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, n. 4, p. 606 - 25, **2008**.
- TROISI, G.; BARTON, S. & BEXTON, S. Impacts of oil spills on seabirds: Unsustainable impacts of non-renewable energy. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, n. 37, p. 16549 - 16555, **2016**.
- USDA-FAS (U.S. Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service), Global Agricultural Information Network (GAIN) Report: "Argentina Biofuels Annual 2015". July 2015. Disponível em: <

- http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Biofuels%20Annual_Buenos%20Aires_Argentina_7-1-2015.pdf>. **2015**. Acesso em outubro de 2018.
- USDA-FAS (U.S. Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service), Global Agricultural Information Network (GAIN) Report: “Malaysia Biofuels Annual 2016”. July 2016. Disponível em: <https://gain.fas.usda.gov/recent%20gain%20publications/biofuels%20annual_kuala%20lumpur_malaysia_7-27-2016.pdf>. **2016**. Acesso em outubro de 2018.
- USDA-FAS (U.S. Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service), Global Agricultural Information Network (GAIN) Report: “Biofuels Annual 2018”. March 2018. Disponível em: <https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Biofuels%20Annual_The%20Hague_EU-28_7-3-2018.pdf>. **2018**. Acesso em outubro de 2018.
- USP -United States Pharmacopeia Convention; *US Pharmacopeia 37*, Rockville, **2009**.
- UZOIGWE, C.; BURGESS, J. G.; ENNIS, C. J. & RAHMAN, P. K. S. M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1 - 6, **2015**.
- VAN BEILEN, J. B.; PANKE, S.; RÖTHLISBERGER, M.; LUCCHINI, S.; WITHOLT, B. & FRANCHINI, A. G. Analysis of Pseudomonas putida alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology*, v. 147, n. 6, p. 1621 - 1630, **2001**.
- VAN BEILEN, J. B.; LI, Z., DUETZ, W. A.; SMITS, T. H. M. & WITHOLT, B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology*, v. 58, n. 4, p. 427 - 440, **2003**.
- VANNINI, F.; CHATTOPADHYAY, M.; KODELA, R.; RAO, P. P. N. & KASHFI, K. Positional isomerism markedly affects the growth inhibition of colon cancer cells by NOSH-aspirin: COX inhibition and modeling. *Redox Biology*, v. 6, p. 318 - 325, **2015**.
- VENTURA, G. T.; KENIG, F.; REDDY, C. M.; FRYSSINGER, G. S.; NELSON, R. K.; MOOY, B. V. & GAINES, R. B. Analysis of unresolved complex mixtures of hydrocarbons extracted from Late Archean sediments by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). *Organic Geochemistry*, v. 39, n. 7, p. 846 - 867, **2008**.
- VENTURA, G. T.; SIMONEIT, B. R. T.; NELSON, R. K. & REDDY, C. M. The composition, origin and fate of complex mixtures in the maltene fractions of hydrothermal petroleum assessed by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Organic Geochemistry*, v. 45, p. 48 - 65, **2012**.
- VERGEYNST, L.; WEGEBERG, S.; AAMAND, J.; LASSEN, P.; GOSEWINKEL, U.; FRITT-RASMUSSEN, J.; GUSTAVSON, K. & MOSBECH, A. Biodegradation of marine oil spills in the Arctic with a Greenland perspective. *Science of The Total Environment*, v. 626, p. 1243 - 1258, **2018**.
- VERMA, S.; BHARGAVAA, R. & PRUTHI, V. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 57, n. 4, p. 207 - 213, **2006**.
- VIDMAR, P. & PERKOVIČ, M. Safety assessment of crude oil tankers. *Safety Science*, v. 105, p. 178 - 191, **2018**.
- VISENTAINER, J. V.; CLAUS, T.; SANTOS JR., O. O.; CHIAVELLI, L. U. R. & MARUYAMA, S. A. Analytical Aspects of the Flame Ionization Detection in

- Comparison with Mass Spectrometry with Emphasis on Fatty Acids and Their Esters. *INTECH*, 2014, <http://dx.doi.org/10.5772/57333>.
- VITTE, I.; DURAN, R.; JÉZÉQUEL, R.; CAUMETTE, P. & CRAVO-LAUREAU, C. Effect of oxic/anoxic switches on bacterial communities and PAH biodegradation in an oil-contaminated sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 18, n. 6, p. 1022–1032, 2011.
- WAN, Z. & CHEN, J. Human errors are behind most oil-tanker spills. *Nature*, v. 560, n. 7717, p. 161 - 163, 2018.
- WATT, I. Shorelines clean-up procedures. A discussion pertaining to the Gulf Sanctuary. Pages 20-37 in Establishment of a Marine Habitat and Wild Life Sanctuary for the Gulf Region. Final Report for Phase II, E. Feltamp and F. Krupp, eds., Jubail and Frankfurt, CEC/NCWCD. 1994.
- WAUTERS, G.; HAASE, G.; AVESANI, V.; CHARLIER, J.; JANSSENS, M.; VAN BROECK, J. & DELMÉE, M. Identification of a novel *Brevibacterium* species isolated from humans and description of *Brevibacterium sanguinis* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 6, p. 2829 - 32, 2004.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego, p. 315 – 322, 1990.
- WILSON, A. M. W. & FORSYTH, C. Restoring near-shore marine ecosystems to enhance climate security for island ocean states: Aligning international processes and local practices. *Marine Policy*, v. 93, p. 284–294, 2018.
- WU, M.; WEN, J.; CHANG, M.; YANG, G. & ZHOU, S. *Pseudomonas sihuiensis* sp. nov., isolated from a forest soil in South China. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 4, p. 781 - 90, 2014.
- WU, M.; LI, W.; DICK, W. A.; YE, X.; CHEN, K.; KOST, D. & CHEN, L. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere*, v. 169, p. 124 - 130, 2017.
- XIA, W. & BUDGE, S. M. Simultaneous quantification of epoxy and hydroxy fatty acids as oxidation products of triacylglycerols in edible oils. *Journal of Chromatography A*, v. 1537, p. 83 - 90, 2018.
- XIN, Y. H.; ZHOU, Y. G. & CHEN, W. X. *Ancylobacter polymorphus* sp. nov. and *Ancylobacter vacuolatus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, n. 6, p. 1185 - 1188, 2006.
- YOSHINAGA, K.; ASANUMA, M.; MIZOBE, H.; KOJIMA, K.; NAGAI, T.; BEPPU, F. & GOTOH, N. Characterization of cis- and trans-octadecenoic acid positional isomers in edible fat and oil using gas chromatography–flame ionisation detector equipped with highly polar ionic liquid capillary column. *Food Chemistry*, v. 160, p. 39 - 45, 2014.
- ZAFRA, G.; ABSALÓN, Á. E.; CUEVAS, M. D. C. & CORTÉS-ESPINOSA, D. V. Isolation and Selection of a Highly Tolerant Microbial Consortium with Potential for PAH Biodegradation from Heavy Crude Oil-Contaminated Soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 225, n. 2, p. 1 - 18, 2014.
- ZAFRA, G.; ABSALÓN, A. E.; ANDUCHO-REYES, M. A.; FERNANDEZ, F. J. & CORTÉS-ESPINOSA, D. V. Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere*, 172, 120 - 126, 2017.
- ZOUARI, O.; LECOUTURIER, D.; ROCHEX, A.; CHATAIGNE, G.; DHULSTER, P.; JACQUES, P. & GHRIBI, D. Bio-emulsifying and biodegradation activities of

- syringafactin producing *Pseudomonas* spp. strains isolated from oil contaminated soils. *Biodegradation*. doi:10.1007/s10532-018-9861-x, **2018**.
- ZOUEKI, C.; W.; GHOSHAL, S. & TUFENKJI, N. Bacterial adhesion to hydrocarbons: Role of asphaltenes and resins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, n. 1, p. 219 - 226, **2010**.
- ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 10, n. 1, p. 1 - 49, **1946**.
- ZHANG, H.; WANG, Z.; LIU, O. Development and validation of a GC–FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 5, p. 223 - 230, **2015**.
- ZHANG, Y. & MILLER, R. M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, p. 3276 - 3282, **1992**.
- ZHAO, L.; TORLAPATI, J.; BOUFADEL, M. C.; KING, T. L.; ROBINSON, B. & LEE, K. VDROD: a comprehensive model for droplet formation of oils and gases in liquids - incorporation of the interfacial tension and droplet viscosity. *Chemical Engineering Journal*, v. 253, p. 93 - 106, **2014**.
- ZHANG, Y.; WONG, W-T. & YUNG, K-F. One-step production of biodiesel from rice bran oil catalyzed by chlorosulfonic acid modified zirconia via simultaneous esterification and transesterification. *Bioresource Technology*, v. 147, p. 59 - 64, **2013**.
- ZHU, X.; VENOSA, A. D.; SUIDAN, M. T. & LEE, K. Guidelines for the Bioremediation of Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. *Environmental Protection*, p. 163, **2001**.

9. APÊNDICES

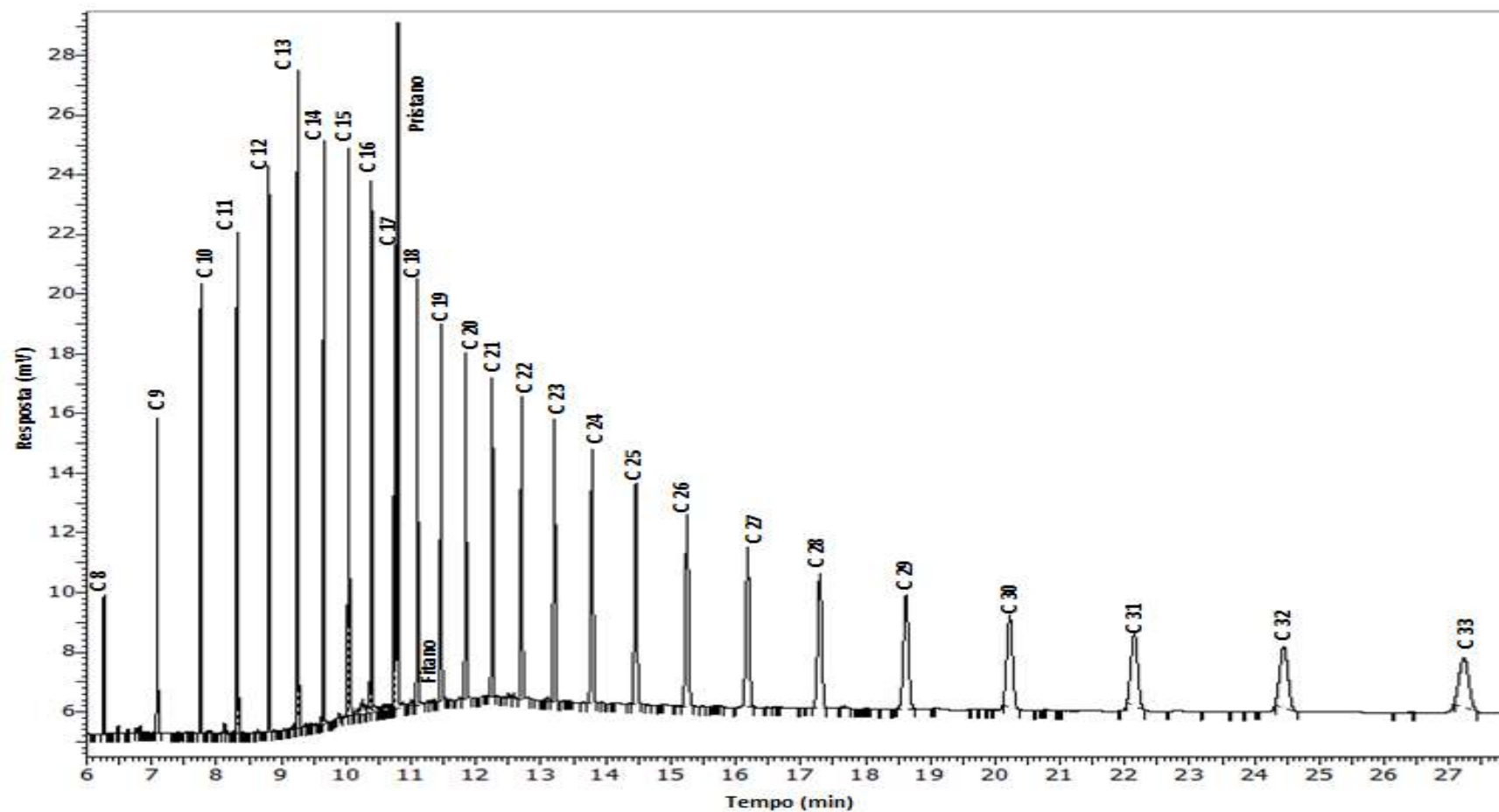


Figura AAA-1. Perfil cromatográfico da mistura de padrões de alcanos alifáticos saturados não ramificados do C8 a C33, acrescido com os padrões ramificados pristano e fitano.

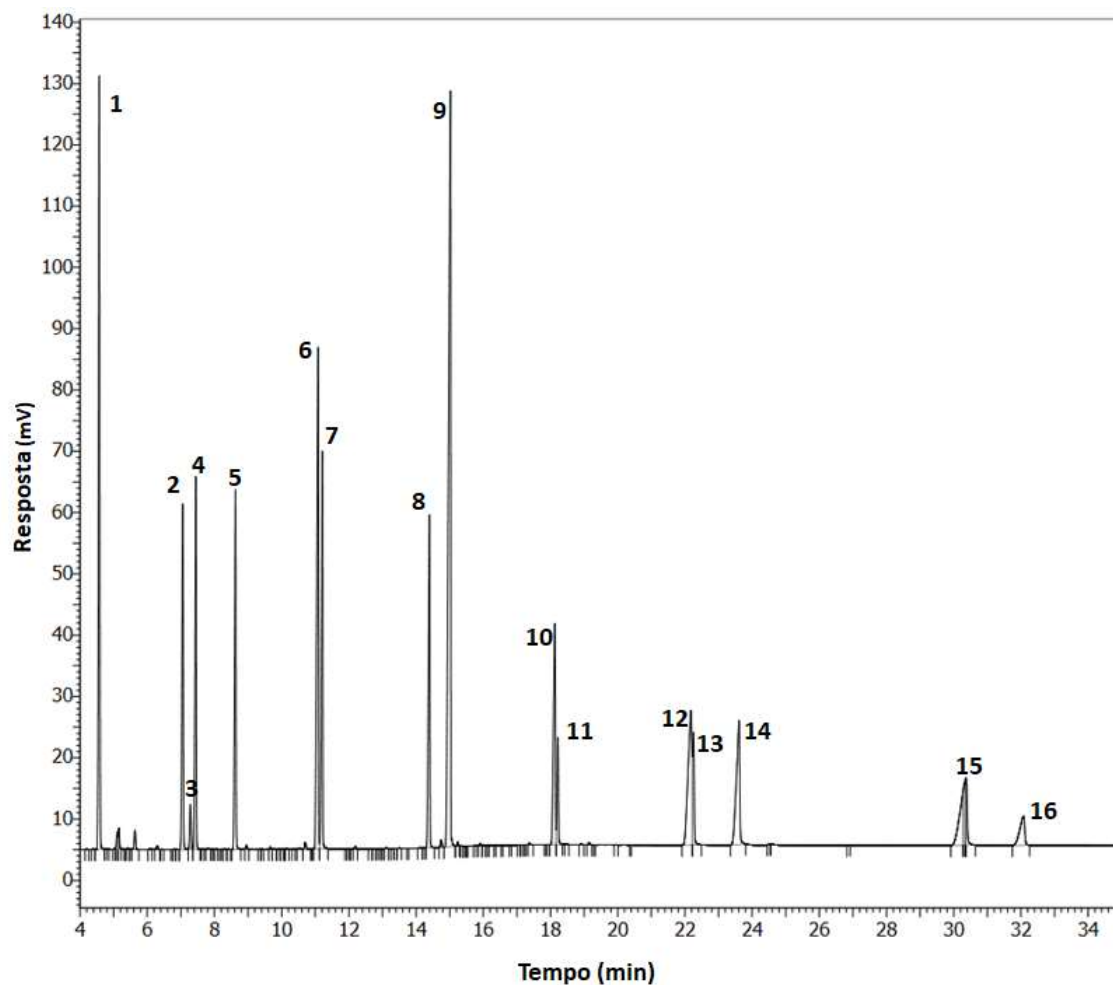


Figura AAB-1. Perfil cromatográfico da mistura dos 16 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), classificado como poluentes prioritários de acordo com a USEPA: naftaleno (1), acenaftileno (2), acenafteno (3), flúoreno (4), fluoranteno (5), antraceno (6), fenantreno (7), benzo [a] antraceno (8), pireno (9), criseno (10), benzo [b] fluoranteno (11), benzo [k] fluoranteno (12), benzo [a] pireno (13), indeno [1,2,3-cd] pireno (14), dibenzo [a, h] antraceno (15) e benzo [g, h, i] perileno (16) classificado como poluentes prioritários de acordo com o US-EPA.

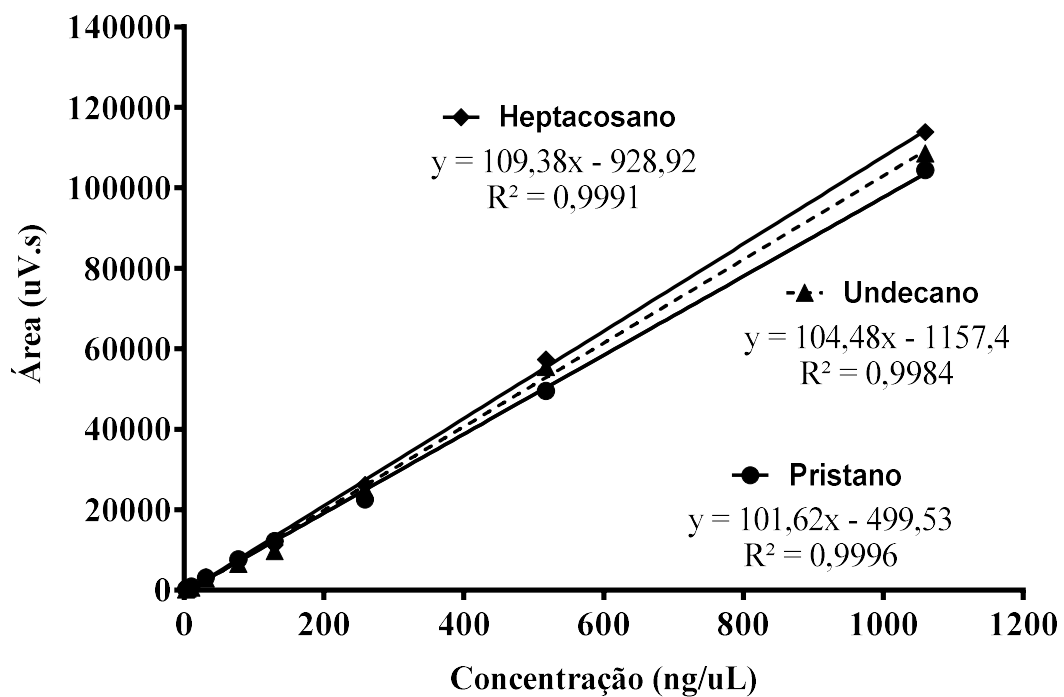


Figura AAC-1. Curvas de calibração para a determinação quantitativa dos percentuais de biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos. Padrões externos: undecano (C8 a C14), pristano (C15 a C21) e heptacosano (C22 a C33), com as suas respectivas equações da reta (y) e coeficientes de correlação linear (R^2).

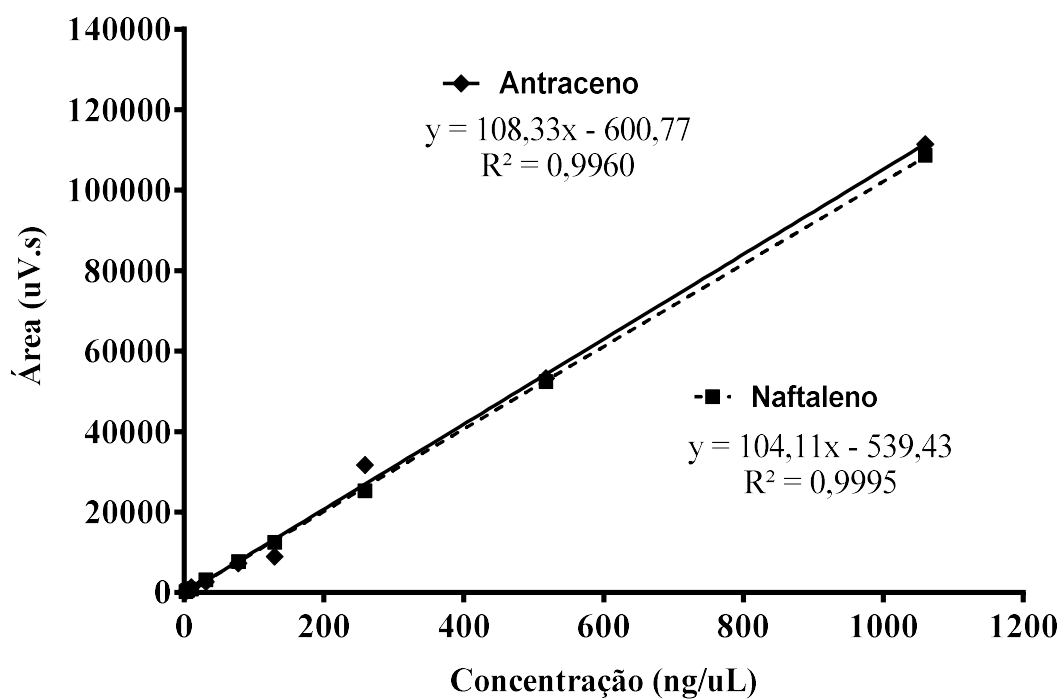


Figura AAC-2. Curvas de calibração de analítica para a determinação quantitativa dos percentuais de biodegradação PAHs. Padrões externos: antraceno e naftaleno, com as suas respectivas equações da reta (y) e coeficientes de correlação linear (R^2).

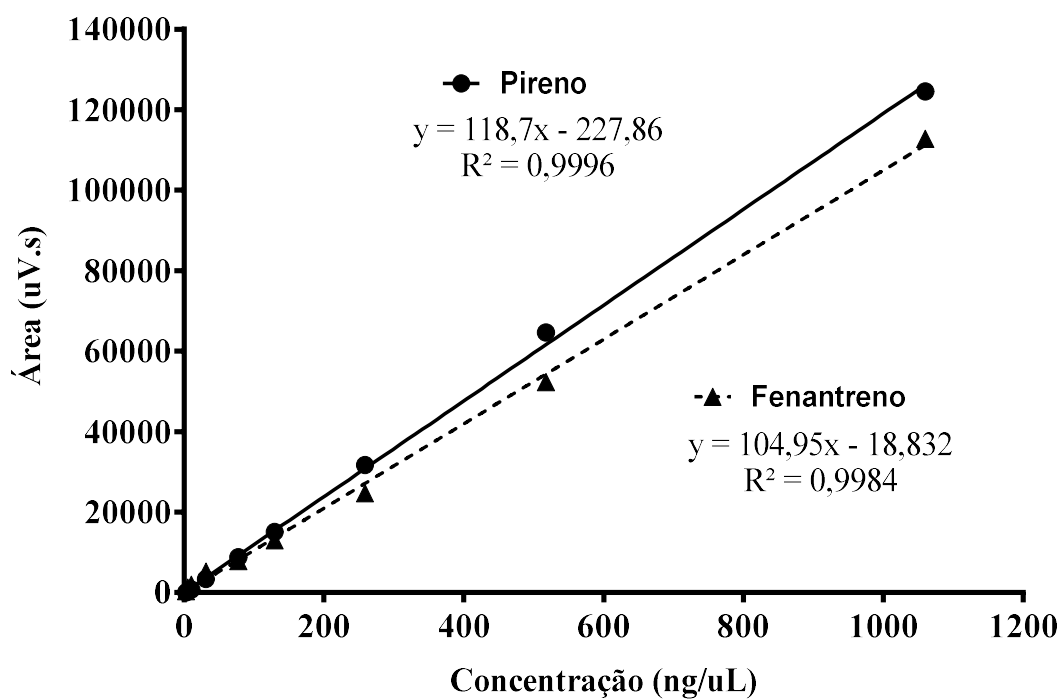


Figura AAC-3. Curvas de calibração de analítica para a determinação quantitativa dos percentuais de biodegradação PAHs. Padrões externos: pireno e fenantreno, com as suas respectivas equações da reta (y) e coeficientes de correlação linear (R^2).

Contig AAD-1 *Candida parapsilosis* SPNLPLE2

Número de acesso no GenBank: LC390138.1.

Sequência de nucleotídeos (543 bases).

>Contig

```
TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCGAATT
TGGAAGAAGTTTTGGAGTTTGTACCAATGAGTGGAAAAACCTATCCATTAGTTTATACTC
CGCCTTTCTTTCAAGCAAACCCAGCGTATCGCTCAACACCAAACCCGAGGGTTTGAGGGAG
AAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA
TTCGATGATTCACGAATATCTGCAATTCATATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCAT
CGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTATTAAATAATCGGTTGACAT
TAAATAAAATTTGGTTGAGTTTAAATCTCTGGCAGGCCCCATATAGAAGGCCTACCAAAGCA
AAGTTTTCAAAAAAAGAAAAACACATGTGTAAGAAAAAATGCAGTTAAGCACTTTTCATTC
TGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTC
```

Contig AAD-2 *Bacillus methylotrophicus* SAMPNLPB5

Número de acesso no GenBank: JQ023622.1.

Sequência de nucleotídeos (1410 bases).

>Contig

AGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG
TGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTT
GTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCT
TGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAT
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGA
AGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTACAGATGGGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGTTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCC
GCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTCTAATTAGAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCC
CTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGCTGGGCACTCT
AAGGTGACTGCCGGCGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT
TATGACCTGGGCTACACACGTGTTACAACGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGT
TAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACCGCGTGAA
GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGCCACCTTCCGG
AGCCAGC

Contig AAD-3 *Pseudomonas sihuiensis* SPNLPB7

Número de acesso no GenBank: LT629797.1.

Sequência de nucleotídeos (1406 bases).

>Contig

ACCATGCAAGTCGAGCGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTCAGCGGCGGACGGGTGCGT
AATGCCTAGGAATCTGCCCAGTAGTGGGGGATAACGTCCGAAACGGGCGCTAATACCGCA
TACGTCCACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCGGATGAGCCTAGGTC
GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAG
GATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCG
GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACG
TTACCGACAGAATAAGCACCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGC
AAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTG
AAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGG
GTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGTTCCTTGAGAACT
TAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACCT
CAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGG
GAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGG
AGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACG
GCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAG
CTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG
GAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGGGAC
GGT

Contig AAD-4 *Brevibacterium sanguinis* AMPNLPB21

Número de acesso no GenBank: KF963622.1.

Sequência de nucleotídeos (1397 bases).

>Contig

GCAAGTCGAACGCTGAAGCCCCAGCTTGCTGGGGTGGATGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTTCGGGATAAGCCCGGAAACTGGGTCTAATACCGGATA
CGACCTGCTCTCGCATGAGAGTGGGTGGAAAGTTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCC
TATCAGTTTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGG
GCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCAGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGTACCG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTACGAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGGTCACGTCTGCTGTGAAACGCAACGCTTAACGTTG
CGCGTGCAGTGGGTACGGGCTGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGTCTGGAATTCCTGGTGTAG
CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGACTCTGGGCTGTAA
CTGACACTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCATGC
CGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTCTCCGCGCCGTAGCTAACGCA
TTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCT
TGACATAACACCAGACCGGCCTGGAAACAGGTCTTCCCCTTTGGGGTTGGTGTACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTTATGTCTTGGGCTTACGCATGC
TACAAATGGCTGGTACAAAGAGAAGCGACCCCGTGAGGGTCAGCGAATCCCTTAAAGCCAGT
CTCAGTTCGGATCGTAGTCTGCAATTCGACTACGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAG
ATCAGCACCGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTCCACACCGCCCGTCAAGTCACGA
AAGTCGGTAACACCCGAAGCCCGGTGGCCTAACCCCTTATGGGGAGGGGGCCGTC

Contig AAD-5 *Ancylobacter polymorphus* AMPNLPB25

Número de acesso do GenBank: NR_042795.1.

Sequência de nucleotídeos (1356 bases).

>Contig

CACATGCACGTCGAACGCCCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGGATC
TGCCCAATGGTACGGAATAATTCCGGGAAACTGGGACTAATACCGTATGAGCCCGCAAGGG
GAAAGATTTATCGCCATTGGATGAACCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCG
CACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGAT
CCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCCGACGAAGA
TAATGACGGTAGTCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
AAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACATTTAAGT
CAGGGGTGAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAAGTCCCTTGATACTGGGTGTCTCGAGTCC
GGAAGAGGTAAGTGGAAGTGCAGGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACC
AGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGAGGCTAGCCGTTGGTGAGCA
TGCTCATCAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGCCTCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAT
TAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTAGAA
GCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCTTTGACATGTCCCGGACGGTTACCAGAGATGGTTTCT
TCTCTTCGGAGCCGGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCATCATTCAGTTGGGCAC
TCTAGGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGG
CCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCGAACCCGCG
AGGGTAAGCAAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCAT
GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGCGCTAACCGCA
AGGAGGCAGGCGAC

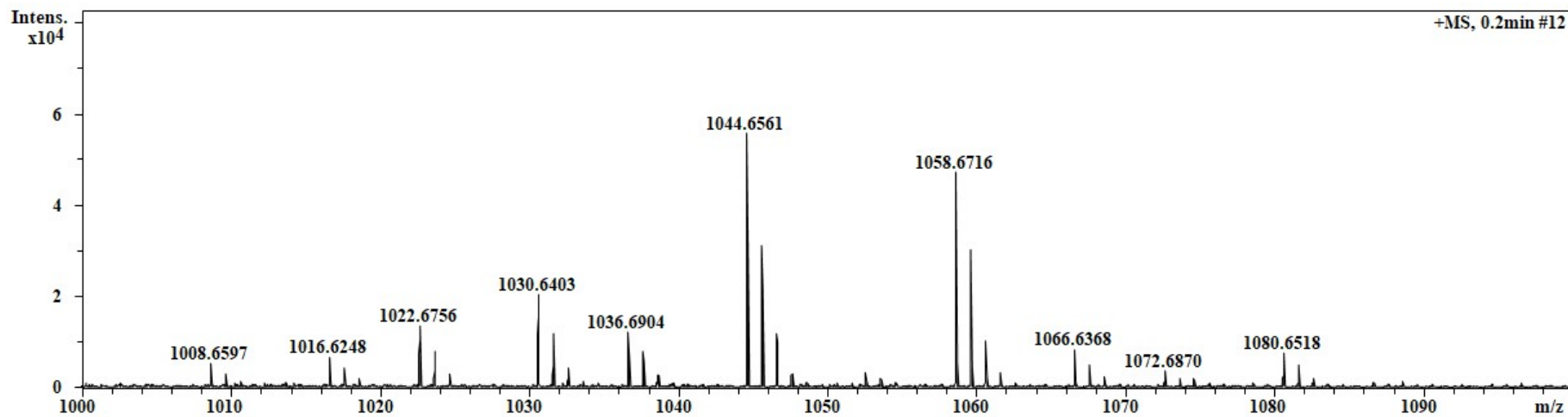


Figura AAE-1. Espectro de massa da Q-TOF-MS no modo de ionização positiva dos íons m/z $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ observados até 5 ppm de erro de massa, das surfacinas e iturinas produzidas pelo *Bacillus methylotrophicus* em água do mar contaminado com hidrocarbonetos alifáticos após 46 dias de incubação.

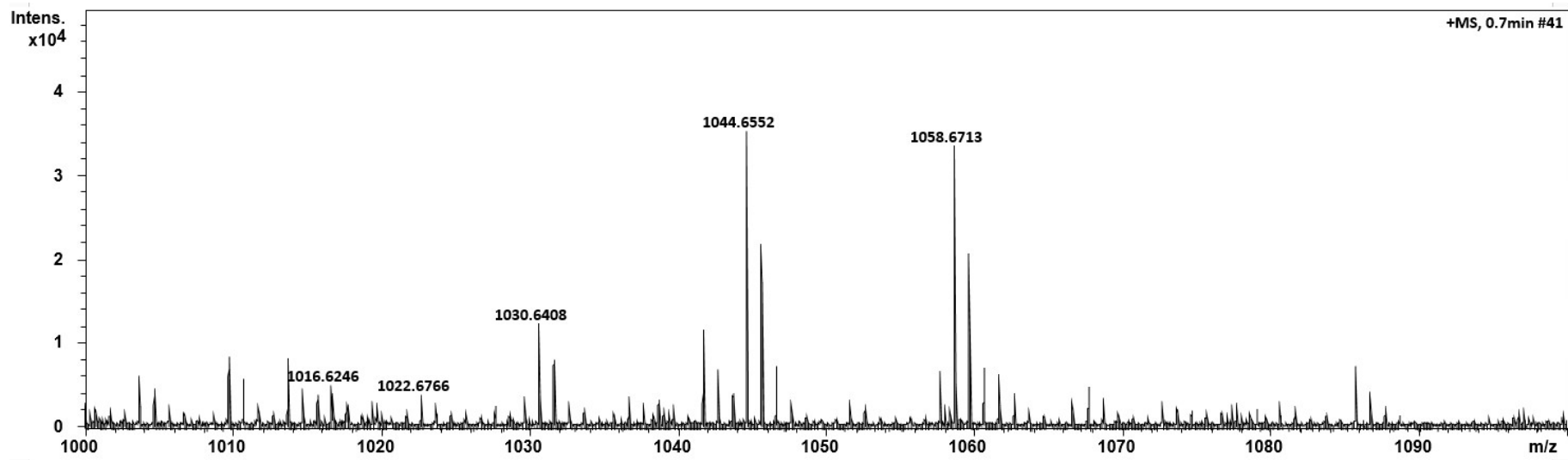


Figura AAE-2. Espectro de massa da Q-TOF-MS no modo de ionização positiva dos íons m/z $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ observados até 5 ppm de erro de massa, das surfacinas produzidas pelo *Bacillus methylotrophicus* em água do mar contaminada com PAHs após 46 dias de incubação.

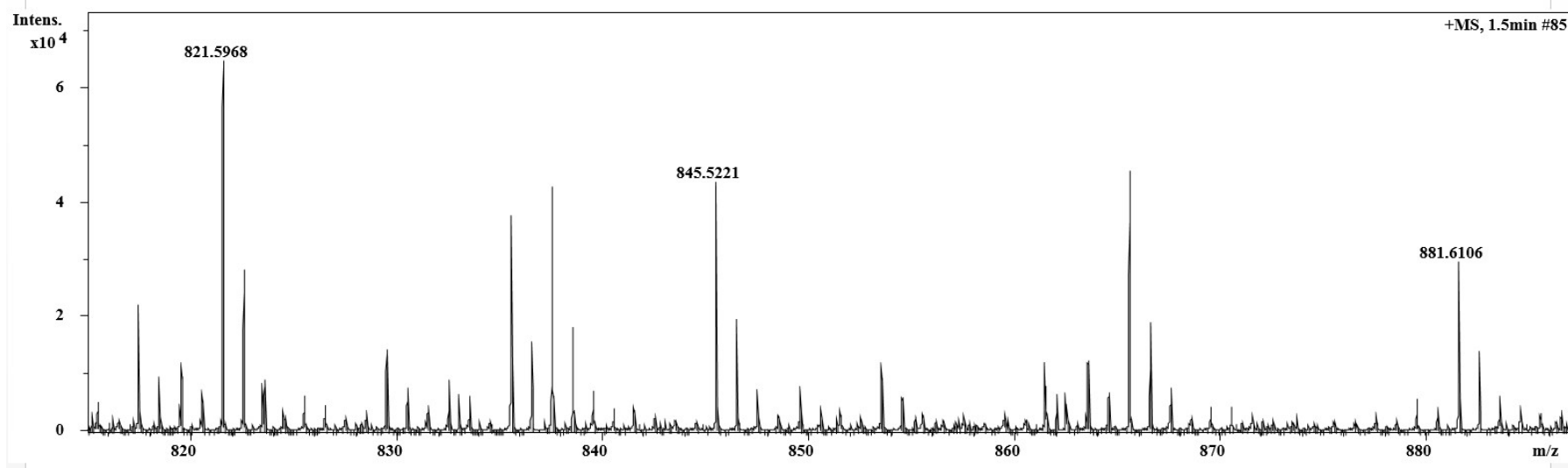


Figura AAF-1. Espectro de massa da Q-TOF-MS no modo de ionização positiva dos íons m/z $[M+H]^+$, $[M+K]^+$ e $[M+Na]^+$ observado até 5 ppm de erro de massa, dos ramnolípídeos produzidos pela *Pseudomonas sihuiensis* em água do mar contaminada com hidrocarbonetos alifáticos.

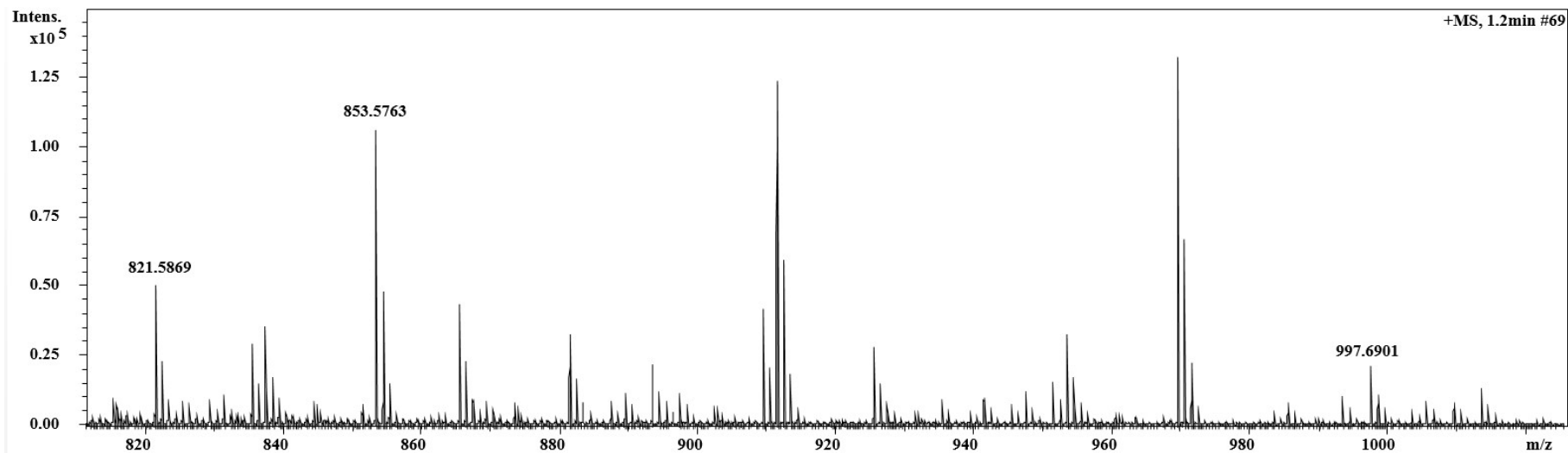


Figura AAF-2. Espectro de massa da Q-TOF-MS no modo de ionização positiva dos íons m/z $[M+K]^+$ observados até 5 ppm de erro de massa, dos ramnolípídeos produzidos pela *Pseudomonas sihuiensis* em água do mar contaminada com PAHs.

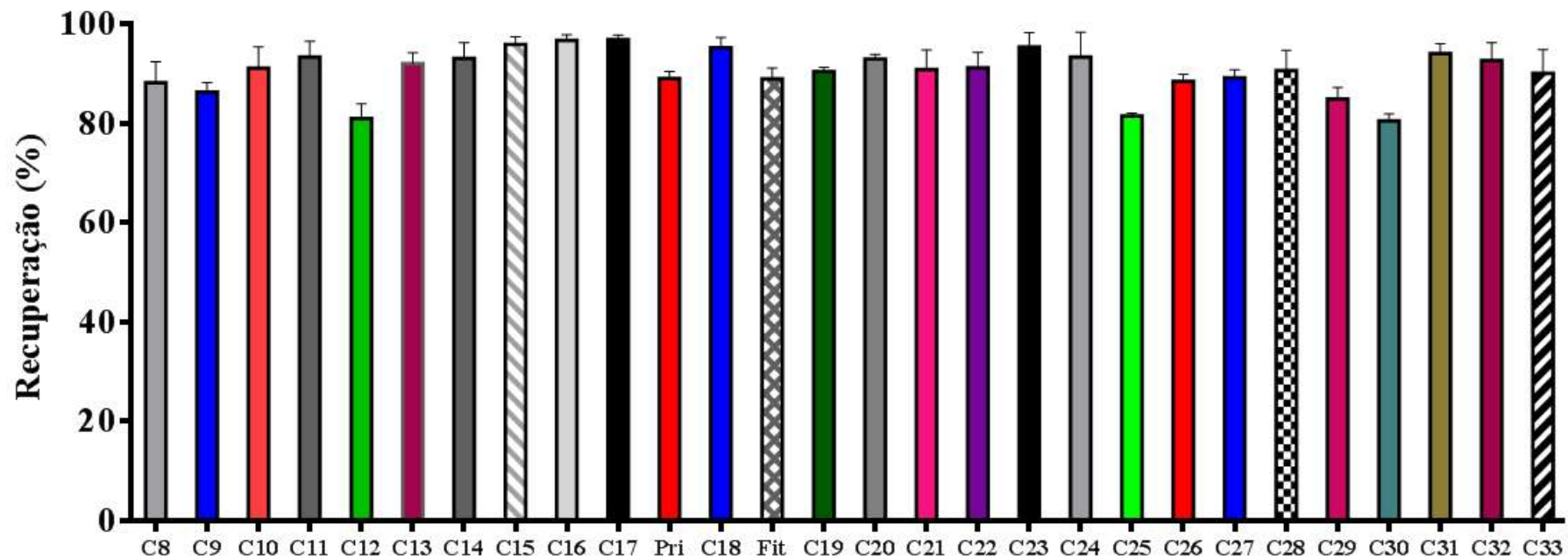


Figura AAG-1. Teste de recuperação dos hidrocarbonetos alcanos alifáticos saturados não ramificados do C8 a C33 e dos padrões ramificados pristano (Pris) e fitano (Fit). As barras de erro representam o desvio padrão relativo percentual (n = 3).

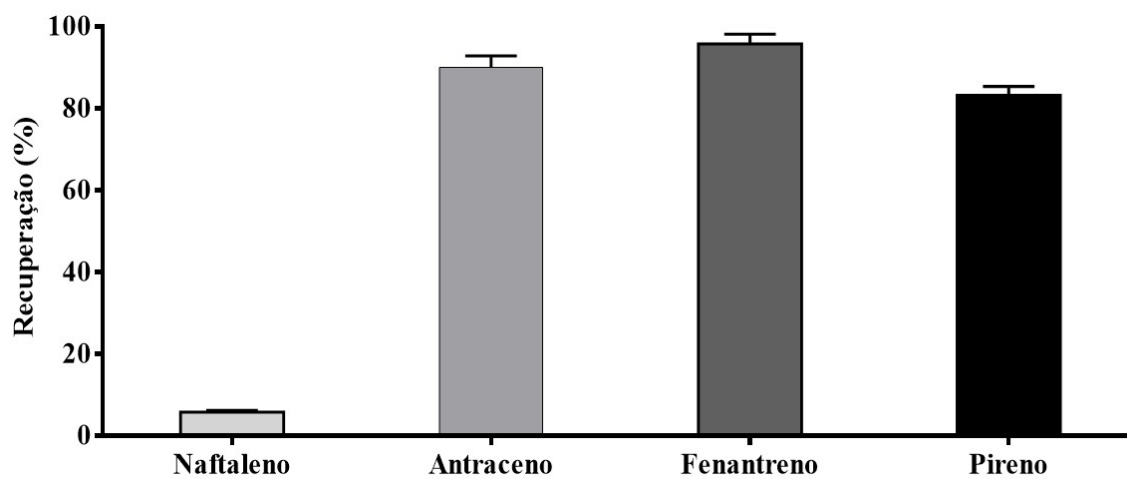


Figura AAG-2. Teste de recuperação dos PAHs. As barras de erro representam o desvio padrão relativo percentual (n = 3).

AAH. Certificado de Análise do heptadecanoato de metila.

SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: METHYL HEPTADECANOATE
analytical standard
Product Number: 51633
Batch Number: BCBL1383V
Brand: Fluka
CAS Number: 1731-92-6
Formula: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOCH}_3$
Formula Weight: 284.48
Expiration Date: MAY 2016
Quality Release Date: 10 JUN 2013

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER TO FINE CRYSTALS (MAY ALSO BE SOLIDIFIED MASS)	POWDER
PURITY (GC AREA %)	≥ 99.0 %	99.7 %
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

10. CURRICULUM VITAE RESUMIDO

EVANDRO PEREIRA; PEREIRA, EVANDRO; PEREIRA, JOSÉ EVANDRO S.;
PEREIRA, J. E. S.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: José Evandro Saraiva Pereira

Local e data de nascimento: Osório, Rio Grande do Sul, Brasil, 26 de outubro de 1974.

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500; Setor 4; Prédio 43421; Lab. 220;
Porto Alegre, RS; CEP: 91501-970.

Telefone profissional: +55 51 33087767

E-mail: jespjbp@ig.com.br

2. FORMAÇÃO

Curso de graduação: Químico industrial, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil. Período: 2003-2010.

Título: Qualidade do Biodiesel Produzido na Unidade Piloto Instalada no Centro Social Marista.

Orientadora: Dra. Jeane Estela de Lima Dullius.

Curso de graduação: Licenciatura Plena em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil. Período: 2003-2011.

Título: Estudo teórico-prático de ensino e aprendizagem em Química na realidade escolar através de atividades de sondagem. Centro Estadual de Formação de Professores General Flores da Cunha (Instituto de Educação/RS).

Orientador: Dr. Maurivan Güntzel Ramos.

Curso de Pós-Graduação: Mestrado *stricto sensu* pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGTEMA), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil. Período: 2011-2013.

Título: Síntese de biodiesel a partir do farelo de arroz via catálise enzimática.

Orientadora: Dra. Rosane Angelica Ligabue.

Coorientadora: Dra. Jeane Estela de Lima Dullius.

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Curso de Pós-Graduação: Doutorado *stricto sensu* pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Período: 2014-2018.

Título: Caracterização de isolados microbianos para biorremediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.

Orientadora: Dra. Marilene Henning Vainstein.

Coorientadora: Dra. Fátima Menezes Bento.

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

1. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Teórico-Prático de Microbiologia - Ênfase em Biotecnologia. (Carga horária: 45 h).
Período 2015 - 2015. Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha,
SALZANO, Brasil.

II Escola de Biodiesel - Produção de biodiesel via catálise química. (Carga horária: 16 h).
Período 2012 - 2012. Fundação de Ciência e Tecnologia, CIENTEC, Brasil.

Técnicas Analíticas: Capacitação e Instrumentação. (Carga horária: 15 h). Período 2010
- 2010. Faculdade de Química/PUCRS, Porto Alegre, Brasil, FAQ/PUCRS, Brasil.

Credenciamento ao Centro de Microscopia. (Carga horária: 4 h). Período 2009 - 2009.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

2. ESTÁGIOS

Vínculo: Iniciação científica. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,
PUCRS, Brasil. Período: 2009-2010. *Aplicação de Resíduos Industriais no Seqüestro de
CO₂ e seu Auxílio na Mitigação das Mudanças Climáticas.*

Descrição: Caracterização físico-química e mineralógica dos materiais; caracterização da
superfície do material mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV); testes de
lixiviação conduzidos segundo diversas metodologias internacionais normatizadas,
caracterizados dos cátions por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) após
lixiviação, sendo estes submetidos ao processo de carbonatação acelerada, os carbonatos
obtidos foram caracterizados e pesquisa bibliográfica.

Vínculo: Iniciação científica. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil. Período: 2008-2009. *Desenvolvimento de Processos de Produção de Biodiesel a partir de Resíduos de Óleos Vegetais.*

Descrição: Caracterização do óleo de farelo de arroz degomado não comestível, determinando o seu índice de acidez, síntese do etil éster de ácidos graxos livres por esterificação para uma posterior transesterificação, estudo do catalisador sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) na síntese, determinar dos melhores parâmetros reacionais, melhorar o percentual da mistura entre os álcoois (metanol e etanol), para que ocorra a separação espontânea da glicerina do biodiesel, purificar o biodiesel de suas impurezas, quantificação por cromatografia gasosa, determinação do percentual de seletividade em alquil-ésteres e percentual em ésteres em cada mistura dos álcoois após as reações de transesterificação e pesquisa bibliográfica.

Vínculo: Monitoria. Carga horária: 18 h. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil. Período: 2007-2007. Síntese Orgânica I, sob a orientação do professor Dr. André Arigony Souto.

Estágio Voluntário. Carga horária: 20 h. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil. Período: 2007-2007. Projeto: Desenvolvimento de Método Analítico para Análise de Alcalóides Presentes na Planta *Datura Faustosa*, sob a orientação do professor Dr. André Arigony Souto.

Vínculo: Monitoria. Carga horária: 20 h. Núcleo de Apoio a Ciência e Matemática (NAENCIM). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

Período: 2005-2006. Museu de Ciências e Tecnologia, sob a orientação da professora Me. Concetta Schifino Ferraro.

3. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Minicurso de Produção de Biodiesel. VII Semana Acadêmica da Química. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil. Período: 2010-2010. Sob a orientação da professora Dra. Jeane Estela de Lima Dullius.

Estágio Curricular. Docência em Química. Período: 2010-2010. Centro Estadual de Formação de Professores General Flores da Cunha, INSTIT. EDUCAÇÃO, Brasil. Estudo teórico-prático de ensino e aprendizagem em Química na realidade escolar através de atividades de sondagem, planejamento, regência de classe, acompanhamento e avaliação, bem como realização de estudos e pesquisas com vistas à reflexão sobre a ação nessa etapa da formação inicial. Sob a orientação do professor Dr. Maurivam G. Ramos.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

I Salão de Jovens Pesquisadores em Biocombustíveis. Purificação de Biodiesel de óleo de fritura via rota etílica com adsorventes bentonita e zirconita, *BIOCOM - 5º Simpósio Nacional de Biocombustíveis*. 2012.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

EVANDRO PEREIRA; NAPP, AMANDA; BRAUN, JOÃO V.; SEFERIN, MARCUS; AYRES, JEANE; LIGABUE, ROSANE; FONTOURA, LUIZ A. M.; PASSAGLIA, LUCIANE M. P.; VAINSTEIN, MARILENE H. Development and validation of analytical methodology by GC-FID using hexadecyl propanoate as an internal standard to determine the bovine tallow methyl esters content. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B*, v.1093, p. 134-140, 2018.

NAPP, AMANDA P.; **PEREIRA, JOSÉ EVANDRO S.**; OLIVEIRA, JORGE S.; SILVA-PORTELA, RITA C. B.; AGNEZ-LIMA, LUCYMARA F.; PERALBA, MARIA C. R.; BENTO, FÁTIMA M.; PASSAGLIA, LUCIANE M. P.; THOMPSON, CLAUDIA E.; VAINSTEIN, MARILENE H. Comparative metagenomics reveals different hydrocarbon degradative abilities from enriched oil-drilling waste. *CHEMOSPHERE*, v. 209, p. 7-16, 2018.

EVANDRO PEREIRA; EINLOFT, SANDRA; SEFERIN, MARCUS; DOS SANTOS, LEONARDO MOREIRA; LIMA, JEANE; LIGABUE, ROSANE. Enzymatic Degradation of the Rice Bran: Problem or Opportunity? *Waste and Biomass Valorization*, v. 9, p. 1, 2017.

BRAUN, JOÃO VITOR; DOS SANTOS, VINÍCIUS OLIVEIRA BATISTA; MAZZINI FONTOURA, LUIZ ANTONIO; **PEREIRA, EVANDRO**; NAPP, AMANDA; SEFERIN, MARCUS; DULLIUS, JEANE ESTELA DE LIMA; LIGABUE, ROSANE; VAINSTEIN, MARILENE HENNING. GC-FID methodology validation for the fatty esters content determination in biodiesel with hexadecyl acetate as the internal standard. *QUÍMICA NOVA*, v. 40, p. 1111-1116, 2017.

EVANDRO PEREIRA; DOS SANTOS, LEONARDO M.; EINLOFT, SANDRA; SEFERIN, MARCUS; DULLIUS, JEANE. Biodiesel Production from High FFA Degummed Rice Bran Oil by a Two-Step Process Using Ethanol/Methanol and a Green Catalyst. *Waste and Biomass Valorization*, v. 6, p. 343-351, 2015.

KUNZLER, CLEITON; ALVES, NATACHA; **PEREIRA, EVANDRO;** NIENCZEWSKI, JONATÃ; LIGABUE, ROSANE; EINLOFT, SANDRA; DULLIUS, JEANE. CO₂ storage with indirect carbonation using industrial waste. *Energy Procedia*, v. 4, p. 1010-1017, 2011.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

EVANDRO PEREIRA; AMANDA NAPP; SARA ALLEBRANDT; MARIA DO CARMO PERALBA; LUCIANE PASSAGLIA; FÁTIMA BENTO; MARILENE VAINSTEIN. Biorremediação de ambiente marinho por micro-organismos autóctones. In: *4º Salão de Iniciação Científica e Tecnológica. IV SICT-CIENTEC*, 2017.

EVANDRO PEREIRA; AMANDA NAPP; SARA ALLEBRANDT; MARILENE VAINSTEIN. Optimization of a fractioning method for petroleum hydrocarbons determination. In: *Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium - LABS9*, 2016, Rio de Janeiro/Brazil.

BRAUN, J. V.; SANTOS, V. O. B.; FONTOURA, L. A. M.; **PEREIRA, J. E. S.** Validação de metodologia analítica por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama para a determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel de óleo de canola e de soja com

acetato de hexadecila como padrão interno. In: 9º Simpósio Nacional de Biocombustíveis, 2016, Teresina/PI. *9º Simpósio Nacional de Biocombustíveis Teresina/PI*, 2016.

PEREIRA, J. E. S.; BRAUN, J. V.; NAPP, A. P.; FONTOURA, L. A. M.; SEFERIN, M.; LIMA, J. E. A.; LIGABUE, R. A.; VAINSTEIN, M. H. Development and validation of analytical methodology by GC-FID using hexadecyl propanoate as internal standard to determine the fatty esters content in bovine tallow biodiesel. In: *6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel*, 2016.

EVANDRO PEREIRA; AMANDA NAPP; CAROLINE AGLIARDI; JOÃO VITOR BRAUN; JEANE DULLIUS; ROSANE LIGABUE; MARCUS SEFERIN; LUIZ MAZZINI; MARILENE VAINSTEIN. Synthesis and Application of Hexadecyl Ethanoate as Internal Standard by GC-FID for the Determination of Content of Fatty Esters of Biodiesel. In: *XVI Encontro do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular*, 2015, Porto Alegre/RS.

7. PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO

EVANDRO PEREIRA. Participação em banca de Francine Campana e Paula Machado. Utilização de torta de linhaça no preparo de barras alimentícias. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

EVANDRO PEREIRA. Participação em banca de Alessandra Cristina Dapper. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama para a determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel de óleo de canola por padronização interna com acetato de hexadecila. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Luterana do Brasil.