

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**USO DE MICRO-ORGANISMOS PARA A REMOÇÃO DE METAIS EM
ÁGUAS DE PRODUÇÃO OBTIDAS A PARTIR DA EXTRAÇÃO DO
PETRÓLEO**

Juliana Pinheiro de Souza

Prof^a. Dr^a. Juliana Severo Fagundes Pereira

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues

Co-orientadora

Porto Alegre, dezembro de 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JULIANA PINHEIRO DE SOUZA

**USO DE MICRO-ORGANISMOS PARA A REMOÇÃO DE METAIS EM
ÁGUAS DE PRODUÇÃO OBTIDAS A PARTIR DA EXTRAÇÃO DO
PETRÓLEO**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutora em Química

Prof^a. Dr^a. Juliana Severo Fagundes Pereira
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues
Co-orientadora

Porto Alegre, dezembro de 2020

“Insanidade é continuar fazendo
sempre a mesma coisa e esperar
resultados diferentes”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós Graduação em Química pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado e financiamento de projetos de pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Juliana Severo Fagundes Pereira, pela orientação, incentivo diário, amizade e pela total disponibilidade em discutir as questões que envolveram o trabalho durante o tempo de execução do mesmo.

À Prof^a. Dr^a. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues pela co-orientação, ensinamentos e contribuição significativa durante a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Mariele Henning Vainstein (UFRGS), por fazer parte da banca examinadora, por suas valiosas contribuições para este trabalho e pela total disponibilidade em utilizar os laboratórios do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

À Dr^a. Fabiane Goldschmidt Antes (Embrapa) e aos Profs. Drs. Andreia Neves Fernandes (UFRGS) e Klester dos Santos Souza (UFRGS) pela participação na banca examinadora e pelas contribuições significativas no aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes por participar da banca examinadora de qualificação e pelas contribuições para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Núcleo de Química Analítica Aplicada (NUQA), pela amizade pelos auxílios e companhia ao longo do doutorado, em especial à Jhulia Boff, pela ajuda direta na realização desse trabalho.

Aos colegas do Centro de Biotecnologia da UFRGS, em especial ao Matheus da Silva Camargo (CBiot, UFRGS) pela amizade, pelas discussões e pela ajuda direta na realização dos ensaios microbiológicos.

Aos meus pais, Paulo Sérgio e Maribel, pelo apoio incondicional em todas as horas, por me incentivarem na busca do melhor e por me apoiarem nos momentos mais difíceis.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO PERÍODO

Resumos em congressos

1. **Souza, J. P.;** Boff, J. L.; Machado, E. Q.; Camargo, M. S.; Vainstein, M. H.; Rodrigues, R. S. B.; Pereira, J. S. F. Utilização de micro-organismos para a remoção de metais em águas de produção. In: IV Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry, IX National Meeting on Environmental Chemistry, XII Workshop on Recent Advances on Sample Preparation e II CORSAN Seminar on Research and Innovation, 2019, Bento Gonçalves.
2. Boff, J. L.; **Souza, J. P.;** Vainstein, M. H.; Rodrigues, R. S. B.; Pereira, J. S. F. Utilização de micro-organismos para a remoção de metais em águas de produção de petróleo. In: 26º Encontro de Química da Região Sul, 2019, Caxias do Sul.
3. **Souza, J. P.;** Cerveira, C.; Miceli, T. M.; Machado, E. Q.; Moraes, D. P.; Pereira, J. S. F. Determinação de As, Cd, Hg e Pb por espectrometria de absorção atômica em cereais após avaliação de métodos de preparo de amostras. In: 19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas.
4. Barela, P. S.; Silva, N. A.; Moraes, D. P.; Pereira, J. S. F.; **Souza, J. P.** Microwave-assisted digestion combined with ultraviolet radiation for further determination of trace elements in biodiesel by SF-ICP-MS. In: 46th World Chemistry Congress - IUPAC, 2017, São Paulo.
5. **Souza, J. P.;** Barela, P. S.; Kellermann, K.; Moraes, D. P.; Pozebon, D.; Pereira, J. S. F. Microwave-induced combustion using diluted acids for digestion of petroleum coke and further metals and rare earth elements determination. In: 46th World Chemistry Congress - IUPAC, 2017, São Paulo.

6. **Souza, J. P.;** Barela, P. S.; Camargo, M. S.; Kellermann, K.; Moraes, D. P.; Pereria, J. S. F. Metals determination in produced waters by spectrometric techniques after microwave-assisted ultraviolet digestion. In: 46th World Chemistry Congress - IUPAC, 2017, São Paulo.
7. **Souza, J. P.;** Camargo, M. S.; Barela, P. S.; Kellermann, K.; Moares, D. P.; Pereira, J. S. F. Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta de águas de produção para posterior determinação de metais por ICP-OES.. In: 18° Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis.
8. **Souza, J. P.;** Camargo, M. S.; Barela, P. S.; Moraes, D. P.; Pereira, J. S. F. Determinação de metais em águas de produção por ICP-OES após decomposição assistida por radiação micro-ondas combinada a radiação ultravioleta. In: XXIII Encontro de química da região sul, 2016, Santa Maria.

Artigo completo relacionado com a dissertação publicado em periódico

1. **Souza, J. P.;** Barela, P. S.; Kellermann, K.; Santos, M. F. P.; Moraes, D. P.; Pereira, J. S. F. Microwave-assisted ultraviolet digestion: an efficient method for the digestion of produced water from crude oil extraction and further metal determination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2017**, 32, 2439.

Artigo completo publicado em periódico

1. **Souza, Juliana P.;** Cerveira, Camila; Miceli, Tatiane M.; Moraes, Diogo P.; Mesko, Marcia F.; Pereira, Juliana S. F. Evaluation of sample preparation methods for cereal digestion for subsequent As, Cd, Hg and Pb determination by AAS-based techniques. *Food Chemistry*, **2020**, 321, 126715.
2. Barela, Pamela Susin; **Souza, Juliana Pinheiro;** Pereira, Juliana Severo Fagundes; Marques, Juliana Charão; Müller, Edson Irineu; Moraes, Diogo Pompéu. Development of a microwave-assisted ultraviolet digestion method for biodiesel and subsequent trace elements determination by SF-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2018**, 33, 1049.

3. **Souza, J. P.;** Kellermann, K.; Camargo, M. S.; Moraes, D. P.; Pozebon, D.; Pereira, J. S. F. Sample preparation strategies for petroleum coke digestion and further cerium and lanthanum determination by DSN-ICP-OES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2018**, 33, 1284.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 ÁGUA DE PRODUÇÃO	22
2.2 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS DE ÁGUAS DE PRODUÇÃO PROVENIENTES DA EXTRAÇÃO DE PETRÓLEO	25
2.2.1 Métodos de extração.....	27
2.2.2 Métodos de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas.....	28
2.2.3 Métodos de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas combinada a radiação ultravioleta	29
2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS.....	32
2.3.1 Espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS).....	32
2.3.2 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).....	35
2.4 PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO	37
3. OBJETIVO.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	45
4.1.1 Equipamentos utilizados na etapa de preparo das amostras	45
4.1.2 Determinação de metais por ICP-OES e F AAS	46
4.1.3 Equipamentos utilizados no estudo com os micro-organismos.....	47
4.1.4 Outros equipamentos utilizados	48
4.2 AMOSTRAS, REAGENTES E SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA	48
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	50
4.3.1 Métodos de preparo de amostras para águas de produção provenientes da extração do petróleo	50
4.3.2 Determinação de C e acidez	52

4.3.3	Determinação dos analitos por ICP-OES e por F AAS	52
4.3.4	Avaliação da exatidão do método MW-UV	53
4.3.5	Estudo com os micro-organismos	53
4.3.6	Ensaio de biorremediação em soluções sintéticas	56
4.3.7	Ensaio de biorremediação nas amostras de águas de produção	59
4.3.8	Ensaio de biorremediação em soluções multielementares utilizando <i>Bacillus subtilis</i> , A Sb 1 e A Sb 3	60
5	RESULTADOS	63
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS POR MW-UV PARA DECOMPOSIÇÃO DE ÁGUAS DE PRODUÇÃO PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE METAIS	64
5.1.1	Caracterização das amostras	64
5.1.2	Decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV)	65
5.1.3	Decomposição assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)	68
5.1.4	Determinação de metais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado	70
5.1.5	Avaliação da exatidão do método proposto	75
5.2	ESTUDO COM OS MICRO-ORGANISMOS	77
5.2.1	Isolamento dos micro-organismos naturalmente presentes nas águas de produção de petróleo	77
5.2.2	Seleção dos micro-organismos isolados por tolerância às concentrações de metais em meio nutritivo	79
5.2.3	Identificação morfológica e molecular dos isolados	80
5.2.4	Testes de sensibilidade a concentrações crescentes de cada analito	83
5.2.5	Ensaio de biorremediação em soluções sintéticas	87
5.2.6	Ensaio de balanço de massa	101
5.2.7	Ensaio de biorremediação nas amostras de águas de produção	107

5.2.8	Ensaio de biorremediação nas amostras de águas de produção de petróleo utilizando os micro-organismos isolados.....	111
5.2.9	Ensaio de biorremediação em soluções multielementares utilizando <i>B. subtilis</i> comercial, A Sb 1 e A Sb 3	116
6	CONCLUSÕES	126
7	REFERÊNCIAS.....	129

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Forno de micro-ondas, frasco de quartzo e lâmpada de UV utilizados na decomposição por MW-UV. 31
- Figura 2.** Principais mecanismos de interação dos micro-organismos com os metais. Adaptado de Alencar *et al*⁵⁷. 39
- Figura 3.** Mecanismos de permeação de metais em camadas lipídicas. Representado por M^{2+} ou M, os metais, dependendo da condição do elemento, podem ser transportados por vias dependentes de adenosina trifosfato (permeação carregada e bomba de íon) ou por meios não dependentes de adenosina trifosfato (permeação lipídica). Adaptado de Simkiss.⁵⁸ 40
- Figura 4.** Parâmetros avaliados para a decomposição de águas de produção de petróleo e posterior determinação de metais por ICP-OES. 51
- Figura 5.** Fluxograma das três linhas principais do trabalho que visa o tratamento de águas de produção de petróleo, bem como todas as etapas avaliadas. 62
- Figura 6.** Amostras de águas de produção de petróleo obtidas a partir da extração de petróleo, nomeadas por A, B, C e D. 64
- Figura 7.** Aspecto da amostra original de água de produção de petróleo B (A), solução final obtida após a MW-AD (B) e após a MW-UV (C). 69
- Figura 8.** Micro-organismos isolados das amostras de águas de produção adaptados às condições de baixa disponibilidade de nutrientes e altas concentrações de metais. 80
- Figura 9.** Árvore filogenética dos isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*. 82
- Figura 10.** Testes de sensibilidade para *B. subtilis* (referência) e para os micro-organismos isolados em concentrações crescentes de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr. (Cada ponto de desenvolvimento de colônia representa a diluição da suspensão de micro-organismos. C representa OD em 600 nm de 0,8 abs até diluição de 10^{-4}) (n = 2). 85
- Figura 11.** Testes de sensibilidade para *B. subtilis* comercial e para os micro-organismos isolados em placas de LB sólido sem conter concentração de metais em diferentes temperaturas. 87

Figura 12. (a) Superfície de resposta para a remoção de Fe pelo <i>B. subtilis</i> em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm) e (b) curva de contorno para a remoção de Fe pelo <i>B. subtilis</i> em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm).	91
Figura 13. (a) Superfície de resposta para a remoção de Ca pelo <i>B. subtilis</i> em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm) e (b) curva de contorno para a remoção de Ca pelo <i>B. subtilis</i> em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm).	94
Figura 14. (a) Superfície de resposta para a remoção de Mg pelo <i>B. subtilis</i> em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm) e (b) curva de contorno para a remoção de Mg pelo <i>B. subtilis</i> em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm).	98
Figura 15. Gráficos de balanço de massa após as interações do <i>B. subtilis</i> com os respectivos analitos nas soluções sintéticas utilizando as condições otimizadas nos planejamentos fatoriais (média \pm desvio padrão, n = 3). As partes dos gráficos na cor vermelha referem-se aos valores em % obtidos no sobrenadante, na cor amarela aos valores obtidos na etapa de lavagem e na cor azul referem-se aos valores obtidos na etapa de decomposição.	106
Figura 16. Valores, em %, de remoção após as interações do <i>B. subtilis</i> com os respectivos analitos nas quatro amostras de água de produção de petróleo estudadas. ..	110
Figura 17. Valores, em %, de remoção após as interações do <i>B. subtilis</i> comercial e dos micro-organismos isolados com os analitos na amostra de água de produção de petróleo A.	113
Figura 18. Valores, em %, de remoção após as interações do <i>B. subtilis</i> e dos micro-organismos isolados com os analitos na amostra de água de produção de petróleo C.	115
Figura 19. Valores, em %, de remoção após as interações do <i>B. subtilis</i> comercial e dos micro-organismos isolados com os analitos em soluções sintéticas multielementares.	118
Figura 20. Valores, em %, de remoção após as interações do <i>B. subtilis</i> comercial e dos micro-organismos isolados com os analitos na amostra A com fortificação multielementar.	120

Figura 21. Valores, em %, de remoção após as interações do *B. subtilis* comercial e dos micro-organismos isolados com os analitos na amostra C com fortificação multielementar..... 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Interferências espectrais observadas na técnica de AAS causadas pela sobreposição de linhas analíticas. Adaptado de Welz e Sperling ⁴⁹	34
Tabela 2. Condições operacionais usadas para a determinação dos analitos por ICP-OES.....	46
Tabela 3. Matriz com planejamento fatorial e valores obtidos para fazer os ensaios.	57
Tabela 4. Condições utilizadas nos ensaios de biorremediação nas amostras de águas de produção utilizando <i>B. subtilis</i>	59
Tabela 5. Características das águas de produção obtidas a partir da extração do petróleo utilizadas neste trabalho.	64
Tabela 6. Recuperações (%) obtidas após a avaliação do uso de padrão interno para a determinação de Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, V e Zn por ICP-OES (média ± desvio padrão, n = 3).....	71
Tabela 7. Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, obtidos para todos os analitos por ICP-OES em amostras de água de produção da extração de petróleo após MW-UV. As determinações foram feitas utilizando Sc como padrão interno (média ± desvio padrão, n = 3).	73
Tabela 8. Resultados, em mg L^{-1} , obtidos após a decomposição do CRM (SCP Science EP-H-3 drinking water) por MW-UV. As determinações dos elementos por ICP-OES foram feitas utilizando Sc como padrão interno (média ± desvio padrão, n = 3).....	75
Tabela 9. Micro-organismos isolados a partir das amostras de águas de produção.....	78
Tabela 10. Identificação morfológica e molecular dos micro-organismos isolados.....	81
Tabela 11. Matriz com delineamento experimental para a remoção de Fe (média ± desvio padrão, n = 3). Os ensaios de interação foram feitos utilizando um meio pobre (0,5% glicose e 0,1% de NH_4NO_3) contendo 40 mg L^{-1} de Fe.	90
Tabela 12. Matriz com delineamento experimental para a remoção de Ca (média ± desvio padrão, n = 3). Os ensaios de interação foram feitos utilizando um meio pobre (0,5% glicose e 0,1% de NH_4NO_3) contendo 500 mg L^{-1} de Ca.....	93
Tabela 13. Ensaios adicionais univariados para a remoção de Ca pelo <i>B. subtilis</i> utilizando tempo de 30 min e diferentes quantidades de células (média ± desvio padrão, n = 3).	95

Tabela 14. Avaliação da repetitividade dos ensaios univariados para a remoção de Ca pelo <i>B. subtilis</i> utilizando tempo de 30 min e diferentes quantidades de células (média ± desvio padrão, n = 3).....	96
Tabela 15. Matriz com delineamento experimental para a remoção de Mg (média ± desvio padrão, n = 3). Os ensaios de interação foram feitos utilizando um meio pobre (0,5% glicose e 0,1% de NH ₄ NO ₃) contendo 500 mg L ⁻¹ de Mg.....	97
Tabela 16. Valores obtidos em % para a concentração de Fe após os ensaios de interação do <i>B. subtilis</i> e as respectivas lavagens da biomassa (média ± desvio padrão, n = 3).	103
Tabela 17. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do <i>B. subtilis</i> com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo A (média ± desvio padrão, n = 3).....	108
Tabela 18. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do <i>B. subtilis</i> com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo B (média ± desvio padrão, n = 3).....	109
Tabela 19. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do <i>B. subtilis</i> com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo C (média ± desvio padrão, n = 3).....	109
Tabela 20. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do <i>B. subtilis</i> com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo D (média ± desvio padrão, n = 3).....	109
Tabela 21. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 1 com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo A (média ± desvio padrão, n = 3).....	112
Tabela 22. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 3 com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo A (média ± desvio padrão, n = 3).....	112
Tabela 23. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 1 com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo C (média ± desvio padrão, n = 3).	114
Tabela 24. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 3 com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo C (média ± desvio padrão, n = 3).	114

Tabela 25. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do <i>B. subtilis</i> comercial com os analitos em solução sintética multielementar (média ± desvio padrão, n = 3).	117
Tabela 26. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 1 com os analitos em solução sintética multielementar (média ± desvio padrão, n = 3).	117
Tabela 27. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 3 com os analitos em solução sintética multielementar (média ± desvio padrão, n = 3).	117
Tabela 28. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do <i>B. subtilis</i> comercial com os analitos na amostra A com fortificação multielementar (média ± desvio padrão, n = 3).	119
Tabela 29. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 1 com os analitos na amostra A com fortificação multielementar (média ± desvio padrão, n = 3).	119
Tabela 30. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 3 com os analitos na amostra A com fortificação multielementar (média ± desvio padrão, n = 3).	119
Tabela 31. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do <i>B. subtilis</i> comercial com os analitos na amostra C com fortificação multielementar (média ± desvio padrão, n = 3).	121
Tabela 32. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 1 com os analitos na amostra C com fortificação multielementar (média ± desvio padrão, n = 3).	121
Tabela 33. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 3 com os analitos na amostra C com fortificação multielementar (média ± desvio padrão, n = 3).	121

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC**, coleção de culturas americana, do inglês *American Type Culture Collection*
- CRM**, material de referência certificado, do inglês *certified reference material*
- DNA**, ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*
- DQO**, demanda química de oxigênio
- EDL**, lâmpada de descarga sem eletrodo, do inglês *electrodeless discharge lamp*
- EDTA**, ácido etilendiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*
- ET AAS**, espectrometria de absorção atômica com aquecimento eletrotérmico, do inglês *electrothermal atomic absorption spectrometry*
- F AAS**, espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*
- GF AAS**, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*
- ICP-MS**, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*
- ICP-OES**, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*
- IS**, padrão interno, do inglês *internal standard*
- IUPAC**, União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- LOQ**, limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*
- LB**, Luria Bertani
- MEV**, microscopia eletrônica de varredura, do inglês *scanning electron microscopy*
- MW-AD**, decomposição assistida por radiação micro-ondas, do inglês *microwave-assisted digestion*
- MW-UV**, decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta, do inglês *microwave-assisted ultraviolet digestion*
- OD**, densidade óptica, do inglês *optical density*
- PTFE**, politetrafluoretileno
- RCC**, teor de carbono residual, do inglês *residual carbon content*
- RNA**, ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*
- Sb**, *Sabouraud*

TOC, carbono orgânico total, do inglês *total organic carbon*

UV, ultravioleta

RESUMO

A etapa de produção de petróleo é um dos segmentos da indústria petroquímica com maior potencial de impacto sobre o meio ambiente pelos riscos de derramamentos de óleo e a geração de grandes volumes de resíduos, em especial às águas de produção de petróleo. Esse efluente possui constituição complexa e dentre outros aspectos, pode apresentar altas concentrações de metais que devem ser removidos pela formação de incrustações nas tubulações das unidades de exploração (quando a água é reinjetada) causando prejuízos enormes. Dessa forma, a remoção de metais, como Ba, Ca, Fe, Mg e Sr dessas águas de produção é de grande relevância. Neste trabalho, o método de decomposição por via úmida assistida por micro-ondas e ultravioleta (MW-UV) foi primeiramente avaliado para a decomposição das águas de produção provenientes da extração de petróleo para a subsequente determinação de metais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e após foi feita a avaliação da remoção dos metais das amostras utilizando processos de biorremediação. A decomposição das amostras por MW-UV foi eficiente com, cerca de, 8 g de água de produção de petróleo, 0,8 mol L⁻¹ de HNO₃ e 0,4 mL de H₂O₂ por 5 min de rampa e 10 min de aquecimento a 700 W. Após tratamento por MW-UV, o teor de carbono orgânico total em solução foi reduzido em 98, 80, 78 e 48% para as amostras A, B, C e D, respectivamente e a acidez residual foi inferior a 0,41 mol L⁻¹ para todas as amostras. Para avaliar os processos de biorremediação foram isolados 3 micro-organismos (duas bactérias e uma levedura) das amostras reais e as bactérias isoladas foram utilizadas para os ensaios de remoção de metais, juntamente com *Bacillus subtilis* ATCC 6633 comercial que foi utilizado como referência. Para os ensaios de remoção, as condições otimizadas foram: tempo de 9 min e densidade óptica em 600 nm de 1,08 abs para Fe e Mg e, tempo de 3 min e densidade óptica em 600 nm de 2,20 abs para Ca, Ba e Sr. Nessas condições foram obtidas altas remoções para Ba e Fe, 50,6 e 90,0%, respectivamente, em amostras sintéticas enquanto que para Ca, Mg e Sr foram obtidas remoções de 4,75, 4,95 e 14,7%, respectivamente. A aplicabilidade para as amostras reais foi estudada e o comportamento do *B. subtilis* ATCC 6633 e dos micro-organismos isolados foram semelhantes em função das diferentes características das amostras (teor de carbono orgânico diferente). As remoções obtidas para todos os analitos nas amostras reais, principalmente para Ba e Fe, foram adequadas (remoção na ordem de 50 e 90% para Ba e Fe, respectivamente) para que o processo de biorremediação seja utilizado de forma complementar aos tratamentos convencionais das águas de produção de petróleo.

Palavras-chave: Águas de produção, MW-UV, metais, biorremediação, *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

The oil production stage is one of the segments of the petrochemical industry with the greatest potential for impact on the environment due to the risks of oil spills and the generation of large volumes of waste, especially produced waters from the crude oil extraction. This effluent has a complex constitution and among other aspects, it can present high concentrations of metals that should be removed due to the formation of precipitates that can cause clogging of oil production lines and many damages. Thus, the removal of metals, such as Ba, Ca, Fe, Mg and Sr from the produced water from crude oil extraction is great relevance. A sample preparation method based on microwave-assisted ultraviolet digestion (MW-UV) was evaluated for the first time to treat produced waters from crude oil extraction for the subsequent determination of metals by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and after the evaluation of the removal of metals from the samples was made using bioremediation processes. Digestion of samples by MW-UV was efficient with about 8 g of produced water, 0.8 mol L⁻¹ of HNO₃ and 0.4 mL of H₂O₂ for 5 min of ramp and 10 min of heating at 700 W. Under these conditions, the TOC in solution was reduced by 98, 80, 78 and 48% for samples A, B, C and D, respectively, and residual acidity was lower than 0.41 mol L⁻¹ for all samples evaluated. For the bioremediation studies, three microorganisms (two bacteria and one yeast) were isolated from the real samples and bacteria were used for the metal removal tests together with commercial *Bacillus subtilis* ATCC 6633, which was used as a reference. For the removal tests, the optimized conditions were: time of 9 min and OD in 600 nm of 1.08 abs for Fe and Mg and, time of 30 min and OD in 600 nm of 2.20 abs for Ca, Ba and Sr. Under these conditions, high removals were obtained for Ba and Fe, 50.6 and 90.0%, respectively, in synthetic solutions whereas for Ca, Mg and Sr removals of 4.75, 4.95 and 14.7% were obtained, respectively. The applicability of bioremediation processes was studied and the behavior of *B. subtilis* ATCC 6633 and the isolated microorganisms were similar due to the different characteristics of the samples (different organic carbon content). The removals obtained for all analytes, mainly for Ba and Fe (removals in the order of 50 and 90% for Ba and Fe, respectively), were suitable for the bioremediation process to be used in a complementary way to the conventional treatments of produced waters.

Keywords: Produced waters, MW-UV, metals, bioremediation and *Bacillus subtilis*.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a indústria do petróleo ainda tem grande importância no contexto energético, econômico e estratégico de todo o mundo. O petróleo é uma das principais fontes de energia utilizadas pela humanidade, fornecendo diversos bens de consumo considerados indispensáveis, como a produção de combustíveis como diesel, gasolina, óleos lubrificantes, GLP, produtos químicos, entre tantos outros. Entretanto, trata-se de um dos setores com maior potencial de impacto sobre o meio ambiente, que causa diversos problemas relacionados à exploração, tais como: riscos de acidentes e derramamentos de óleo, degradação ambiental, desmatamentos e impactos sobre o ecossistema marinho e terrestre, além dos impactos relacionados a queima de combustíveis obtidos a partir do petróleo. A degradação do meio ambiente marinho pode ser resultado de diversas fontes, tais como as de origem terrestre que contribuem com a poluição marinha e as atividades de transporte marítimo e descarga no mar.¹⁻³

A exploração do petróleo é uma das etapas que mais gera impactos nos recursos naturais sendo, as águas de produção de petróleo, o efluente gerado em maior volume durante o seu processo de extração. A ocorrência deste efluente se deve ao processo de formação do reservatório (água de formação) e, ainda, às grandes quantidades de água, contendo aditivos químicos, que podem ser injetadas no poço para facilitar o escoamento de óleo. As águas de produção são consideradas como uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos que podem estar dispersos e/ou dissolvidos. São encontrados, em quantidades relativamente altas, íons, como por exemplo, Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , SO_4^{2-} , Br^- , HCO_3^- e I^- .³ Estima-se que para um barril de petróleo extraído são gerados três barris de águas de produção, o que caracteriza esse efluente como sendo o de maior volume gerado durante a extração de petróleo e gás nas plataformas em plataforma marítima. Este efluente pode ser descartado ou reciclado e reutilizado. A reciclagem das águas de produção provenientes da extração de petróleo é uma alternativa promissora, especialmente para os campos de produção localizados em áreas com problemas de escassez de água.^{2,3} No entanto, para que este efluente seja reciclado ou reutilizado, é necessário que alguns contaminantes sejam removidos parcialmente ou totalmente.

Alguns elementos como Ba, Ca, Fe, Mg e Sr podem estar presentes nas águas de produção e, estes elementos podem formar compostos pouco solúveis que causam incrustações e o conseqüente entupimento das tubulações das linhas de produção, causando enormes prejuízos para a indústria petrolífera. Desta forma, a determinação de metais nas

águas de produção provenientes da extração do petróleo é de extrema relevância tanto para fins de descarte deste resíduo, a fim de evitar efeitos nocivos ao meio ambiente, como para a sua reinjeção, visando evitar os problemas relacionados à corrosão e entupimento das linhas de produção.³

Atualmente, o tratamento dessas amostras de águas de produção é feito com a utilização de flutuadores, coalescedores, hidrociclones e filtros os quais são usados na remoção de sólidos em suspensão, óleos disperso, biomassa bacteriana, hidrocarbonetos voláteis e gases corrosivos.³ Em vista do elevado teor de óleo presente nas águas de produção, no Brasil órgãos, como o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através de resolução 393/2007, art. 5º, regulamentam o descarte desse efluente, que deve obedecer a concentração média aritmética simples mensal de óleos e graxas até 29 mg L⁻¹, com valor máximo diário de 42 mg L⁻¹.⁴ Para a concentração máxima de metais não há uma norma específica para águas de produção de petróleo. Entretanto, a descarga desse efluente segue a resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que estabelece os limites máximos para descarte de efluente de qualquer fonte poluidora. Nesta resolução, encontram-se as concentrações máximas de 5,0 e 15 mg L⁻¹ para Ba e Fe, respectivamente. Metais como Ca, Mg e Sr não possuem limites máximos estabelecidos.⁵ Requisitos regulamentares tornam-se mais rigorosos com relação à descarga deste efluente pois a presença de metais em efluentes industriais traz uma série de problemas ambientais e de saúde. Cabe destacar que a presença de concentrações elevadas de metais nas amostras de águas de produção demonstra a dimensão da poluição gerada pelo descarte incorreto desse efluente. Considerando o fato de que os organismos marinhos estão habituados às baixas concentrações de metais nas águas do mar, a alteração destes níveis, pelo descarte das águas de produção ao ambiente, pode acarretar danos severos à biodiversidade.⁶

Paralelamente, vários processos vêm sendo aplicados para a remoção de metais em águas de produção, como colunas de troca iônica, redução fotocatalítica, precipitação, ultrafiltração, osmose reversa, entre outros. No entanto, estes processos podem levar a remoções incompletas dos metais, produção de contaminantes secundários, alto gasto de energia e alto custo de operação. Em vista disso, uma das alternativas que vem sendo estudadas para a remoção de metais em diversos tipos de efluentes é o emprego de processos de biorremediação os quais utilizam micro-organismos como efetivos sorventes. A relevância ambiental e o baixo custo agregam a este método uma grande potencialidade de aplicação.^{1,7-9}

Para que seja avaliada a eficiência de remoção de metais neste tipo de efluente é necessário que seja feita uma etapa de caracterização prévia visando a determinação de metais. Para isto, é necessário utilizar métodos de preparo de amostras adequados tendo em vista a presença de carbono orgânico total (TOC) e a alta salinidade das amostras de águas de produção o que torna um desafio a determinação de metais em níveis traço neste tipo de matriz. Devido a isso, poucos estudos foram relatados na literatura até o momento referente ao tratamento ou decomposição deste tipo de amostra. Além disso, a presença de sólidos suspensos pode causar diversos problemas na etapa de determinação, principalmente quando são utilizadas técnicas de introdução de amostra por nebulização pneumática, pois as partículas sólidas podem intupir o sistema de introdução e consequentemente, danificar o equipamento ou obter resultados errôneos.¹⁰⁻¹³

Neste sentido, nos últimos anos, a decomposição por MW-UV foi proposta inicialmente para decomposição de amostras em solução. Este método tem se tornado muito atrativo uma vez que a combinação da radiação micro-ondas com a radiação ultravioleta pode reduzir o teor de carbono orgânico em solução, mesmo na presença de ácidos diluídos, aumentando assim a eficiência de decomposição.¹⁴⁻¹⁹ As reações de foto-oxidação que ocorrem durante a decomposição de amostras, geralmente, são induzidas via mecanismo radicalar. Dessa forma, a geração de radicais $\cdot\text{OH}$, os quais possuem elevado poder oxidante, promove a oxidação e a degradação das espécies orgânicas, resultando na decomposição quase que total das amostras.²⁰ Cabe destacar que este método de preparo de amostras já foi aplicado para tratamento de águas naturais visando reduzir o teor de carbono orgânico em solução para posterior determinação de Pd¹⁶ ou para outros tipos de amostras como petróleo¹⁹, coque de petróleo¹⁸, algas marinhas¹⁷, chocolate¹⁵, margarina²¹ e biodiesel²². Mas até o momento, não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando este método de preparo de amostras para tratamento de águas de produção de petróleo.

Nesse sentido, o presente trabalho visou i) desenvolver um método de preparo de amostras para decomposição de águas de produção de petróleo visando a posterior determinação de metais e ii) o uso de micro-organismos para a remoção de metais neste tipo de amostra. No que se refere ao método de preparo de amostras, devido à alta salinidade, elevado teor de matéria orgânica e sólidos dissolvidos presentes nas águas de produção obtidas da extração do petróleo, esta etapa envolve algumas dificuldades. Diante disso, o método de decomposição assistida por radiação micro-ondas combinada com a radiação ultravioleta (MW-UV) foi avaliado pela primeira vez neste trabalho para a

decomposição de águas de produção para posterior determinação de metais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Foram avaliados os parâmetros que influenciam na decomposição das amostras de águas de produção, como as concentrações de HNO₃ e volume de H₂O₂, potência da radiação micro-ondas e tempo de aquecimento. Após as otimizações da MW-UV, a decomposição assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) também foi feita nas mesmas condições para fins de comparação. A eficiência da decomposição foi avaliada pela determinação da concentração de C e pela acidez residual nas soluções finais. A exatidão do método foi avaliada pela decomposição de material de referência certificado de água com alto teor de sais e através de ensaios de recuperação.

Cabe destacar que não foram encontrados trabalhos na literatura que utilizem processos de biorremediação visando a remoção de metais em amostras de águas de produção provenientes da extração de petróleo. Após a caracterização das amostras, procedeu-se aos estudos com os micro-organismos para que estes fossem utilizados nos processos de biorremediação. Para isso, as quatro amostras de águas de produção foram cultivadas em meio de cultivo adequado para crescimento e isolamento de micro-organismos presentes nessas amostras e, portanto, adaptados ao meio. Estes micro-organismos foram isolados e submetidos à identificação morfológica e molecular e, após foram submetidos a ensaios de sensibilidade para avaliar a tolerância em concentrações crescentes de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr.

Os processos de biorremediação foram estudados e foram avaliadas as melhores condições de interação dos micro-organismos com os metais (tempo de interação e quantidade de micro-organismos) em meio pobre de nutrientes, similar as amostras de águas de produção. Para cálculos de balanço de massa, etapas de lavagem e etapa de decomposição da biomassa de micro-organismos após os ensaios de interação foram feitos a fim de avaliar a concentração de metal internalizado ou fortemente aderido na parede celular do micro-organismo. As melhores condições encontradas para os ensaios de biorremediação utilizando o micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foram aplicadas nas amostras reais de águas de produção. Após, foram também aplicados os micro-organismos isolados das amostras de águas de produção (denominados de A Sb1 e A Sb 3) para avaliar a remoção destes micro-organismos adaptados ao meio em solução sintética pobre de nutrientes e, também, nas amostras de águas de produção. Por fim, foi avaliada a aplicabilidade da remoção pelos micro-organismos em soluções multielementares dos metais estudados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁGUA DE PRODUÇÃO

Na indústria petrolífera, durante a etapa de extração do petróleo, há a geração de uma enorme quantidade de resíduos, sendo o de maior volume, as águas de produção.³ A ocorrência deste efluente se deve ao processo de formação do reservatório (água de formação) e, ainda, às grandes quantidades de água, contendo aditivos químicos, que podem ser injetadas no poço para facilitar o escoamento de óleo. A água de formação, que representa significativamente a maior parte do volume de água de produção de petróleo, refere-se à água do mar ou água doce que há milhões de anos foi aprisionada nos poros das rochas sedimentares as quais sofreram deposições e soterramentos sedimentares. A água de formação também pode ser chamada de água conata, pois pode estar presente em campos de acumulação fósseis e de sistemas hidráulicos fechados, que desde o soterramento não entrou novamente em contato com a superfície. As águas de formação e as águas de produção possuem características diferentes da água do mar ou de rios, uma vez que ao longo do período de aprisionamento, acumularam sais, íons e outras substâncias em que estiveram em contato.^{3,23} É estimado que um campo de petróleo novo produz, em geral, pouca água, mas, a quantidade de água produzida pode alcançar entre 50% e 100% (em volume) à medida que os poços vão envelhecendo.³ Estima-se que para cada barril de petróleo extraído, são gerados cerca de três barris de água de produção, o que evidencia o motivo pelo qual deve ser dada grande atenção para este efluente.²

A água de produção proveniente da extração de petróleo é caracterizada por ser uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos, dispersos e/ou dissolvidos. Os constituintes químicos desse efluente variam em função do poço (idade e profundidade), da formação geológica e, também, dos produtos químicos adicionados na água de injeção. Os hidrocarbonetos são os principais constituintes presentes na forma dispersa (gotículas de óleo), enquanto que na forma dissolvida encontram-se uma grande variedade de compostos orgânicos (por exemplo, cetonas, ácidos carboxílicos e fenóis) e quantidades relativamente elevadas de sais inorgânicos. Alguns íons como Na^+ , Cl^- , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , SO_4^{2-} e Sr^{2+} podem ser encontrados em concentrações na ordem de mg L^{-1} .³

Estima-se que a água de produção represente o maior volume de resíduo gerado durante a extração de petróleo e gás nas plataformas *offshore*, podendo ser descartada ou reciclada e reutilizada. A reciclagem deste efluente é uma alternativa promissora, especialmente para os campos de produção de petróleo localizados em áreas com

problemas de escassez de água. Tendo em vista o elevado teor de óleo presente nas águas de produção provenientes da extração de petróleo, órgãos reguladores de diversos países estabeleceram limites máximos de óleos e graxas (parâmetro indicado para mensurar a quantidade de óleo disperso presente na amostra). No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da resolução 393/2007, art. 5º, regulamenta o descarte desse tipo de efluente, que deve obedecer a concentração média aritmética simples mensal de óleos e graxas até 29 mg L^{-1} , com valor máximo diário de 42 mg L^{-1} . Os requisitos regulamentares tornaram-se mais rigorosos com relação à descarga deste efluente, pois alguns elementos são potencialmente carcinogênicos e/ou capazes de promover a sua bioacumulação em seres vivos, em especial os componentes orgânicos.¹⁻⁴

Com relação a concentração máxima permitida de metais, não há uma norma específica para o descarte de águas de produção de provenientes da extração do petróleo. Em vista disso, a descarga deste efluente segue a resolução 357/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de qualquer tipo de efluente. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos pela resolução. Dentre as exigências dessa resolução, estão as concentrações máximas de metais permitidas, onde é possível destacar as concentrações máximas de $5,0$ e 15 mg L^{-1} para Ba e Fe, respectivamente. Metais como Ca, Mg e Sr não possuem limites máximos permitidos.

Alguns elementos como Ba, Ca, Fe, Mg e Sr podem estar presentes nas águas de produção e, estes elementos podem formar compostos pouco solúveis que causam incrustações e o conseguinte entupimento das tubulações das linhas de produção. Esse fato se torna mais crítico quando a água de injeção for proveniente do mar pelo elevado teor de sulfato. Além da formação de compostos pouco solúveis na forma de sulfatos, podem ser formados compostos na forma de hidróxidos. Dentre os compostos pouco solúveis que podem ser formados e levar ao entupimento das linhas de produção, destacam-se o $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, BaSO_4 , Ca(OH)_2 , CaSO_4 , Fe(OH)_2 , Fe(OH)_3 , Mg(OH)_2 e SrSO_4 , onde os produtos de solubilidade são $2,55 \times 10^{-4}$, $1,1 \times 10^{-10}$, $6,5 \times 10^{-6}$, $2,4 \times 10^{-5}$, $7,9 \times 10^{-16}$, $1,6 \times 10^{-39}$, $5,61 \times 10^{-12}$ e $3,2 \times 10^{-7}$, respectivamente.^{3,24} A ocorrência de entupimentos nas linhas de produção acarreta em enormes prejuízos para a indústria petrolífera, o que torna necessário evitar esse problema.

Todos esses fatores reforçam a necessidade de fazer um tratamento nessas águas de produção antes do descarte a fim de evitar efeitos nocivos que os aditivos químicos presentes nessas águas possam ter sobre o meio ambiente. Além disso, no caso de as águas de produção de petróleo serem reinjetadas, é necessário que estas sejam caracterizadas em relação ao teor de alguns metais, como Ba, Ca, Fe, Mg e Sr, a fim de minimizar a formação de compostos pouco solúveis e, conseqüentemente, inscrustações. Atualmente, as tecnologias disponíveis para o tratamento dessas águas de produção de petróleo têm melhoria significativa nos impactos ambientais causados, tanto devido às regulamentações ambientais, quanto devido as iniciativas da própria indústria quanto ao controle dos teores de óleos e graxas e concentração de metais presentes. Ainda assim, a eficácia dos tratamentos depende de algumas características como tipo do óleo, viscosidade, temperatura, pressão, tipo do poço, salinidade da água, tamanho da gota de óleo, entre outras.^{1,3}

O tratamento dessas águas de produção de petróleo consiste na remoção de sólidos em suspensão, óleos disperso, biomassa bacteriana, hidrocarbonetos voláteis e gases corrosivos, como CO₂ e H₂S. Atualmente, flutuadores, coalescedores, hidrociclones e filtros são os principais equipamentos utilizados para seu tratamento onde as gotículas de óleo presentes são separadas por centrífugas de alta velocidade e filtros membrana. Ainda, alguns produtos químicos podem ser adicionados ao processo de tratamento para melhorar a eficiência da separação de óleo/gás/água. A combinação do tratamento mecânico e químico é eficaz na remoção de compostos voláteis e óleos dispersos, mas é ineficaz na remoção de orgânicos dissolvidos e íons.³ Estudos relatam algumas tecnologias voltadas para a remoção de metais pesados em diversos tipos de efluentes, como a precipitação química, oxidação e redução, filtração, troca iônica, osmose reversa, entre outras.^{3,7,8} No entanto, estes processos podem levar a remoções incompletas dos metais, produção de contaminantes secundários, alto gasto de energia e alto custo de operação. Em vista disso, várias tecnologias ou métodos alternativos têm sido propostos nos últimos anos com o objetivo de garantir uma melhoria na qualidade das águas de produção, tanto para descarte, como para reinjeção desse efluente para facilitar a extração de petróleo.⁹

Desta forma, devido à complexidade da matriz e dos efeitos indesejáveis de vários constituintes presentes nas águas de produção torna-se de suma importância desenvolver métodos alternativos para a caracterização e o tratamento dessas águas para que se tomem medidas adequadas frente aos riscos ambientais quando descartadas no meio ambiente ou quando forem reinjetadas.

2.2 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS DE ÁGUAS DE PRODUÇÃO PROVENIENTES DA EXTRAÇÃO DE PETRÓLEO

A etapa de preparo de amostras é considerada a mais crítica entre todas as etapas envolvidas na sequência analítica, podendo ser a etapa com maior custo, mais suscetível a erros por contaminação, perdas de analito por volatilização, maior tempo de análise, entre outros. Atualmente, a obtenção de resultados com boa precisão e exatidão são alguns dos desafios no desenvolvimento de métodos de preparo de amostras, em decorrência de um menor tempo possível de análise, com mínima manipulação da amostra a fim de evitar contaminações e baixo consumo de reagentes, promovendo a menor geração de resíduos.^{13,25,26}

É importante mencionar que as técnicas que são usualmente empregadas para a determinação de analitos em nível traço, como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), por exemplo, são técnicas que necessitam que a amostra esteja em solução para introdução na chama ou no ICP utilizando sistemas de nebulização de amostra. Adicionalmente, é sabido que a amostra na forma de solução apresenta maior homogeneidade e, portanto, levando à obtenção de resultados mais precisos e exatos.^{13,25} Em vista disso, antes da determinação dos metais por técnicas analíticas com sistemas de introdução de amostras por nebulização, as amostras devem ser submetidas a uma etapa prévia de preparo a fim de remover toda a matéria orgânica suspensa e em solução. É sabido que a presença desses constituintes pode bloquear o sistema de nebulização da amostra e causar interferência devido à presença de carbono.¹⁰⁻¹³

A presença de carbono orgânico total (TOC) e a alta salinidade das amostras de águas de produção são alguns dos desafios para a determinação de metais em níveis traço e, devido a isso, poucos estudos foram relatados na literatura referente ao tratamento ou decomposição deste tipo de amostra.

Alguns trabalhos publicados na literatura relatam a determinação de Cr²⁷, Pb²⁸, e V²⁹ em águas de produção por espectrometria de absorção atômica com aquecimento eletrotérmico (ETAAS). Nestes trabalhos, as amostras foram previamente acidificadas com HNO₃ 10% (v/v) para obter um pH final na faixa de 1,5 a 1,8 e introduzidas diretamente no todo de grafite. Além disso, Cr, Pb e V foram determinados pelo ETAAS empregando calibração externa, onde as soluções de referência foram preparadas em 0,8 mol L⁻¹ de NaCl. Os limites de quantificação (LOQs) foram 1,5, 5,0 e 6,3 mg L⁻¹ para Cr, Pb e V, respectivamente. Inúmeras vantagens são relacionadas com a análise direta das

amostras, como o menor tempo de análise em vista da redução das etapas de preparo de amostras, menores riscos de contaminação por manipulação das amostras, menor consumo de reagentes e produção de resíduos, entre outros. No entanto, a falta de homogeneidade da amostra e a presença de materiais particulados podem comprometer a precisão dos resultados analíticos.^{13,25} É importante salientar também que, nesses trabalhos, apenas um elemento foi determinado por vez, além de ter-se a necessidade de otimizar a técnica analítica para a quantificação de cada analito e, ainda, foram utilizados diferentes modificadores químicos.²⁷⁻²⁹

Outro trabalho publicado na literatura relata a determinação de As, B, Ba, Mn e Sn em amostra de água de produção proveniente do petróleo bruto da Nigéria. As determinações dos analitos foram feitas utilizando um espectrofotômetro de UV-vis. Para isso, foi necessário otimizar a técnica analítica e realizar um procedimento de preparo de amostras para a quantificação de cada analito, o que compromete a frequência analítica. Para a determinação de As, foi necessário adicionar à 20 mL de amostra, soluções de KI, HCl, azul de toluidina e acetato de sódio e estas foram deixadas em repouso por 2 min. Após a etapa de repouso foi feita a determinação em espectrofotômetro. Para a determinação de B, o preparo das amostras envolveu procedimentos com os seguintes reagentes: H_3BO_3 , $C_6H_8O_6$, íleto de azometila, CH_3COONH_4 , CH_3COOH glacial, EDTA e $C_2H_4O_2S$. Após a mistura desses reagentes, as soluções foram deixadas em repouso por 30 min e, após, procedeu-se com a determinação em espectrofotômetro. Para os demais metais, Mn, Sn e Ba, a determinação foi feita a partir da curva de calibração de cada analito. As concentrações encontradas para As, B, Mn, Sn e Ba foram de 0,9599, 0,0955, 0,000433, 0,31730 e 0,0019 $mg L^{-1}$, respectivamente. A concentração encontrada para As foi superior a concentração máxima permitida pelos órgãos reguladores cujas concentrações foram baseados em um outro trabalho², o que evidencia a necessidade de tratamento dessas amostras de águas de produção provenientes do petróleo bruto do Delta do Níger para seu descarte e/ou reutilização, especialmente, para As.³⁰

Hardi *et al.*³¹ avaliaram a determinação de metais de amostras de águas de produção provenientes da extração de petróleo da Indonésia. O objetivo deste estudo foi comparar os valores de concentração encontrados para os analitos com os valores máximos permitidos pelo regulamento do governo da Indonésia. Para isso, as amostras de águas de produção de petróleo foram filtradas e acidificadas com HNO_3 até pH 2,00 e, posteriormente foi feita a determinação de As, Ba, B, Cd, Co, Fe, Cu, Pb, Mn, Se e Zn por ICP-OES, Hg foi determinado por um analisador elementar e Cr foi determinado por

espectrofotometria. Os autores concluíram que nas seis amostras analisadas, Ba, B e Se estavam acima do valor máximo permitido para esse efluente ser classificado na classe I (água potável). Entretanto, para as classes II (águas usadas para infraestrutura de recreação, cultivo de peixes, etc) e III (águas utilizadas para irrigação), apenas B estava acima do limite permitido pelo regulamento do governo da Indonésia, o que evidencia uma necessidade de tratamento dessas amostras de águas de produção de petróleo para serem reutilizadas com proteção das pessoas e do meio ambiente.³¹

Neste sentido, nos últimos anos alguns métodos de preparo de amostras têm sido desenvolvidos para a decomposição de amostras de águas de produção. Nesta revisão bibliográfica serão abordados os métodos de preparo de amostra que já foram descritos na literatura para o preparo de águas de produção de petróleo.

2.2.1 Métodos de extração

Atualmente, a necessidade de determinação de metais em amostras ambientais em níveis traço vem sendo usualmente estudada, onde as técnicas analíticas mais utilizadas são a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)³² ou a técnica de ICP-OES³³. Entretanto, essas técnicas apresentam elevado custo de instalação e manutenção e, em vista disso, a técnica de F AAS vem se mostrando como uma técnica bastante difundida e aplicável em amostras previamente submetidas a processos de pré-concentração.^{34,35}

Alguns métodos de preparo de amostras disponíveis na literatura para amostras ambientais envolvem os métodos de extração, como a extração líquido-líquido³⁶, co-precipitação³⁷, microextração³⁸, extração em fase sólida³⁹ e extração em ponto nuvem⁴⁰. Estes métodos têm por princípio a difusão e/ou solubilização dos analitos em um solvente de extração adequado, como por exemplo a utilização de solventes orgânicos.

O método de extração líquido-líquido com base na complexação prévia do metal com o agente quelante pirrolidina-ditiocarbamato, o qual foi posteriormente extraído com metilbutilcetona foi empregado por Dórea *et al.*⁴¹ para extração de metais em águas de produção. As concentrações de Co, Cu, Fe, K, Mn, Na, Ni, Pb e Zn foram determinadas na fase orgânica por F AAS. Os resultados nas amostras de águas de produção variaram de 0,003 a 4540 mg L⁻¹. Dentre as desvantagens deste método de extração destaca-se o tempo de análise e a utilização de grandes volumes de solventes de alta pureza, além da geração de resíduos orgânicos.^{42,43}

Nesse contexto, a extração em ponto nuvem é uma alternativa mais atrativa que a extração líquido-líquido, por reduzir o uso de solventes e o tempo de análise.⁴⁴ Este método se baseia no comportamento de fases de surfactantes em solução aquosa, os quais são separados de fases após o aumento de temperatura ou adição de um agente quelante.⁴⁵ Bezerra *et al.*⁴⁶ propôs o método de extração em ponto nuvem para posterior determinação de Cd, Co, Cr e Mn em águas de produção. Os analitos foram removidos como complexos de ditizona e a determinação dos mesmos foi feita por F AAS. A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de fortificação e as recuperações obtidas foram na faixa de 88 a 109% para os analitos em amostras com salinidades de 40 a 63%.

Em ambos os estudos^{41,46}, o uso de solventes orgânicos pode ser considerado uma desvantagem, pois estes podem ser tóxicos e além disso, geram resíduos passíveis de serem tratados.

2.2.2 Métodos de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas

Alguns fatores precisam ser levados em consideração quando se tratado desenvolvimento de métodos de preparo de amostras, dentre estes fatores estão o tempo total de preparo, a eficiência de decomposição, o volume de reagentes utilizados, o número de amostras que podem ser decompostas simultaneamente, entre outros. Os sistemas de decomposição com aquecimento por radiação micro-ondas propiciam um aquecimento mais rápido da solução quando comparados com os sistemas de aquecimento convencional. Este aquecimento consiste na absorção da radiação micro-ondas gerada e incidida sob a amostra líquida para que o aquecimento aconteça através de fenômenos sinérgicos, fazendo com que a solução entre em ebulição mais rápido.^{13,26}

A decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) é baseada no aquecimento da amostra na presença de ácidos inorgânicos oxidantes, uma mistura de ácidos inorgânicos oxidantes ou até mesmo uma mistura de um ácido inorgânico oxidante com H₂O₂, dependendo da complexidade da matriz. Dentre os ácidos inorgânicos oxidantes comumente utilizados, destaca-se o HNO₃ o qual é facilmente encontrado em altos níveis de pureza, possui alto potencial oxidante e a maioria dos elementos químicos forma nitratos solúveis. É possível obter digeridos adequados após este método de preparo de amostras que possibilita a introdução das soluções em uma ampla variedade de equipamentos de determinação, os quais na maioria dos casos requerem que a amostra esteja na forma de solução, livre de materiais particulados e possua baixos teores de TOC.^{13,20,47}

Este método de decomposição apresenta inúmeras vantagens como a diminuição de riscos de contaminação, redução de perdas por volatilização, baixos teores de TOC, obtenção de adequados limites de quantificação, entre outros. Além das vantagens de utilizar a MW-AD, cabe salientar que o uso de sistemas fechados possibilita atingir elevadas pressões, a qual irá conseqüentemente aumentar a temperatura de ebulição do ácido, proporcionando uma maior eficiência de decomposição das amostras.^{13,20,47}

Penha *et al.*⁴⁸ avaliou a determinação de Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Se e V em águas de produção de petróleo após a MW-AD usando ácido nítrico concentrado. Os metais foram determinados por ICP-OES e os autores avaliaram o uso de padrões internos (IS) na etapa de determinação. Foi observado que para Ni não houve necessidade de usar IS, enquanto que para Co, Cr, Fe, Mn e V foram obtidos melhores resultados usando Sc. Para Se, o uso de Y como IS foi recomendado.⁴⁸ No entanto, o uso de mais de um IS no mesmo método é uma desvantagem, pois acaba sendo necessário o uso de condições variáveis para a determinação dos analitos. De acordo com os autores, as amostras utilizadas tinham uma pequena quantidade de óleo e, eles observaram uma alta eficiência de decomposição devido aos baixos níveis de teor de carbono residual (RCC). No entanto, o TOC presente nas amostras originais não foi reportado.

De maneira geral, a desvantagem observada no trabalho desenvolvido por Penha *et al.*⁴⁸ foi a utilização de ácido concentrado, que pode ocasionar alterações significativas das propriedades físicas das soluções digeridas, podendo influenciar na formação do aerossol e resultar na baixa eficiência de transporte do analito até o plasma e ainda, na geração de resíduos químicos passíveis de tratamento. Destaca-se também a utilização de mais de um IS no mesmo método o que conseqüentemente resulta no uso de condições variáveis para a determinação dos analitos.

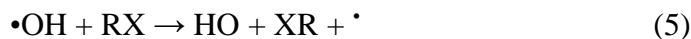
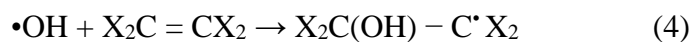
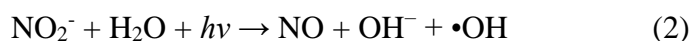
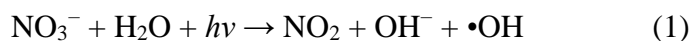
2.2.3 Métodos de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas combinada a radiação ultravioleta

Nos últimos anos, o método de preparo de amostras com base na decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas combinada a radiação ultravioleta (MW-UV) vem se tornando bastante atrativo uma vez que a combinação da radiação micro-ondas com a radiação ultravioleta reduz o TOC em solução mesmo na presença de concentrações ácidas diluídas, aumentando assim a eficiência de decomposição quando comparado a MW-AD.¹⁴⁻¹⁹

A faixa do espectro eletromagnético que corresponde à UV compreende de 40 a 400 nm. As lâmpadas de UV utilizadas neste método são inseridas dentro dos frascos de decomposição, convencionalmente utilizado para a decomposição de amostras, e são ativadas pela radiação micro-ondas. A aplicação simultânea da radiação micro-ondas e ultravioleta promove um sinergismo entre o efeito térmico e a ação fotoquímica, com elevada eficiência devido ao fato da lâmpada de UV estar inserida dentro do frasco em contato com a amostra. A lâmpada de descarga sem eletrodo (EDL) é preenchida com vapor de Cd e Ar (baixa pressão). A parte superior da lâmpada possui uma antena metálica (Mo). Assim que a radiação micro-ondas é incidida na cavidade do forno de micro-ondas, esta é capturada pela antena de Mo e o campo elétrico gerado promove a excitação de alguns átomos do gás nobre, formando elétrons livres. Os elétrons livres se chocam com o metal de preenchimento (Cd) promovendo sua excitação à níveis energéticos mais elevados que, ao retornarem para o estado fundamental, emitem a energia correspondente à transição eletrônica (aproximadamente 228 nm) na região do UV. A radiação UV emitida é transmitida pelo bulbo da lâmpada e, conseqüentemente, é absorvida pela fase líquida presente no interior do frasco reacional.²⁰

As reações de foto-oxidação que ocorrem durante a decomposição de amostras orgânicas, geralmente, são induzidas via mecanismo radicalar. De modo geral, a geração de radicais $\cdot\text{OH}$, os quais possuem escasso tempo de vida e alto poder oxidante, promove a oxidação e a degradação das espécies orgânicas, assim, promovendo a decomposição da amostra. Quando há amostras com alto teor de matéria orgânica tem-se a necessidade da adição de reagentes auxiliares que possuem alto poder oxidante, atuando na oxidação da matéria orgânica como, por exemplo: H_2O_2 , O_3 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e HNO_3 . Dentre esses, destaca-se o H_2O_2 que é o reagente mais empregado nas decomposições de amostras orgânicas em vista da formação de espécies altamente reativas que promovem uma eficiente oxidação.²⁰

O HNO_3 é o ácido mais utilizado nas decomposições por via úmida, devido a sua propriedade oxidante. Além disso, possui capacidade de produzir radicais $\cdot\text{OH}$ na presença da radiação UV, se tornando indispensável na decomposição de amostras orgânicas. As reações que ocorrem com HNO_3 na presença de UV e a degradação de compostos orgânicos pelo radical formado são mostradas abaixo.²⁰



Nas reações (1) e (2), os íons nitrato e nitrito formados pela degradação do HNO_3 interagem com a radiação UV produzindo radicais $\bullet\text{OH}$. Os radicais hidroxila, por sua vez, irão reagir com os compostos orgânicos e poderão captar hidrogênio (3), adicionar-se aos mesmos (4) e/ou transferir elétrons ao composto (5). Os radicais que foram formados na reação podem reagir com o O_2 dissolvido presente no meio e formar radicais orgânicos peroxil (6) que podem ser responsáveis pelo início de reações de oxidação da matéria orgânica, gerando CO_2 , H_2O e sais inorgânico.²⁰

A seguir, na Figura 1, são mostrados o forno de micro-ondas, o frasco e a lâmpada de UV utilizados na decomposição por MW-UV. A lâmpada de Cd, que emite na região do UV (228 nm), é inserida no frasco juntamente com a solução de decomposição e a amostra. Acessórios de PTFE são utilizados para manter a lâmpada na posição vertical e diminuir o atrito com as paredes do frasco e devido a isso, a temperatura máxima que o sistema poderá atingir é 250 °C, para preservação desses acessórios.²⁰

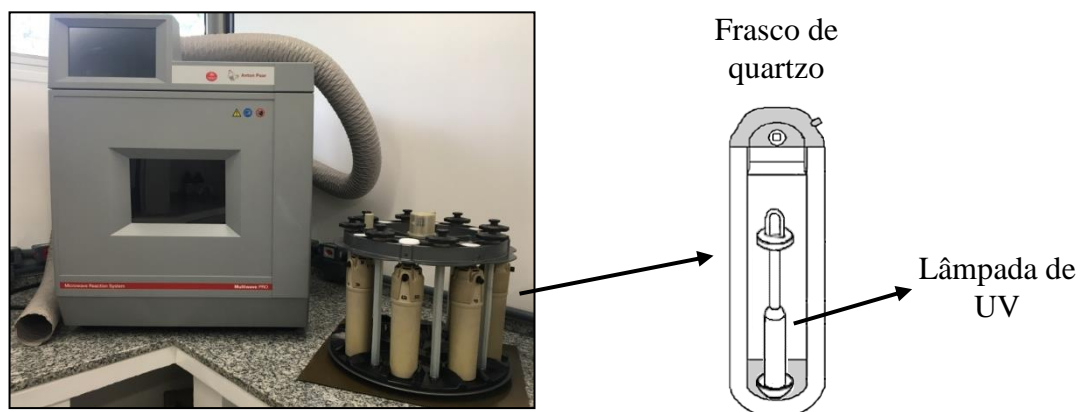


Figura 1. Forno de micro-ondas, frasco de quartzo e lâmpada de UV utilizados na decomposição por MW-UV.

A MW-UV foi utilizada pela primeira vez para a decomposição de leite em pó desnatado e, após, foi feita a determinação de Cd, Pb, Cu e Fe por ICP-OES e

espectrometria de absorção atômica com forno grafite (GF AAS). Os valores obtidos para um CRM apresentaram boa concordância com os valores certificados (teste *t-student*, nível de confiança de 95%).¹⁴ Este método foi posteriormente utilizado para decompor petróleo¹⁹, coque de petróleo¹⁸, algas¹⁷, chocolate¹⁵, margarina²¹ e biodiesel²².

A primeira aplicação reportada na literatura usando a MW-UV para decomposição de águas naturais contendo 11,49 mg L⁻¹ de óleos e graxas foi proposta por Limbeck *et al.*¹⁶ Nesse trabalho, amostras de águas foram decompostas por MW-UV para posterior determinação de Pd por ET AAS.¹⁶ No entanto, esse método foi aplicado apenas para amostras de águas naturais da chuva que não continham alto teor de óleos e graxa ou alta salinidade quando comparado com as amostras de águas de produção. Limbeck *et al.*¹⁶ observou que após as otimizações de alguns parâmetros do método, uma redução de aproximadamente 15 vezes do valor do TOC quando a decomposição foi realizada utilizando 0,1 mol L⁻¹ de HCl, 0,1% de H₂O₂ (v/v) e potência de 1000 W (15 min de rampa e 15 min de aquecimento).

2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS

As principais técnicas analíticas utilizadas na determinação da concentração de metais são as técnicas de espectrometria de absorção atômica (com chama (F AAS) e com forno de grafite (GF AAS)), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. A seguir, serão discutidas as principais características das técnicas de F AAS e ICP-OES as quais foram utilizadas para a determinação de metais neste trabalho.

2.3.1 Espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS)

A espectrometria de absorção atômica com chama está entre as técnicas instrumentais mais simples e de menor custo quando comparadas com as técnicas com plasma indutivamente acoplado para a análise de elementos majoritários em níveis de mg L⁻¹.²⁴

Esta técnica consiste em formar átomos no estado fundamental e gasoso em um atomizador, que posteriormente, em contato com uma radiação incidente, absorvem energia passando para o estado excitado, causando a atenuação do sinal que, por sua vez, é proporcional à concentração dos átomos no atomizador. Como cada espécie atômica só pode existir em alguns estados excitados específicos, as energias dos fótons que poderão ser absorvidos serão específicas de cada espécie atômica.^{24,49}

A formação dos átomos no estado fundamental e gasoso a partir de uma amostra em solução ocorre na célula de absorção ou atomizador. Neste caso, os atomizadores mais empregados na AAS são a chama, forno de grafite e o sistema de geração química de vapor. Os átomos no estado fundamental devem ser obtidos de uma maneira reprodutiva, para que se possa obter dados quantitativos. A amostra normalmente está na forma líquida, havendo várias etapas envolvidas no processo de converter uma amostra líquida em átomos. No caso da absorção atômica com chama, utilizando-se a introdução da amostra por nebulização pneumática, a amostra em solução é nebulizada através de um capilar e um fluxo de ar em alta velocidade, formando pequenas gotas (aerosol líquido). As gotas pequenas são selecionadas e entram na câmara de pré-mistura, onde são misturadas com o gás combustível da chama. Quando as gotas atingem a chama, o solvente é evaporado, produzindo partículas secas (aerosol sólido). Esta etapa é seguida pela vaporização das partículas secas e sua subsequente dissociação em átomos no estado gasoso e fundamental. As chamas comumente utilizadas são constituídas de ar atmosférico e acetileno, as quais podem variar de 2100 °C a 2400 °C.^{24,49}

Algumas interferências na técnica de F AAS podem ser observadas como a sobreposição de linhas analíticas, como mostrado na Tabela 1 para a determinação de Ca, Fe e Mg, analitos que foram determinados pela técnica de F AAS neste trabalho.⁴⁹ Essas interferências de sobreposição de linhas analíticas próximas podem ser corrigidas pela utilização de comprimentos de onda alternativos.⁴⁹

Tabela 1. Interferências espectrais observadas na técnica de AAS causadas pela sobreposição de linhas analíticas. Adaptado de Welz e Sperling⁴⁹.

Elemento	Comprimento de onda, nm	Elemento interferente	Comprimento de onda, nm
Ca	422,673*	Ge	422,657
Fe	271,903	Pt	271,904
Fe	279,470	Mn	279,482
Fe	285,213	Mg	285,213
Fe	287,417	Ga	287,424
Fe	302,064	Cr	302,067
Fe	324,728	Cu	324,754
Fe	327,445	Cu	327,396
Fe	338,241	Ag	338,289
Fe	352,424	Ni	352,454
Fe	396,114	Al	396,153
Fe	460,765	Sr	460,733
Mg	285,213*	Fe	285,179
Mg	285,213*	Tb	285,214

*Comprimento de onda primário. Adaptado de Welz e Sperling⁴⁹

Outros problemas para a determinação dos elementos por F AAS é a formação de compostos pouco solúveis no caminho óptico que podem absorver a radiação proveniente da fonte e o baixo potencial de ionização de alguns elementos como Na e K, que se ionizam com a temperatura da chama.⁴⁹ Essas interferências podem ser corrigidas pela utilização de uma curva de calibração nas mesmas condições que as amostras, utilização de um agente liberador que formará preferencialmente os compostos pouco solúveis deixando o analito livre para absorver a radiação proveniente da fonte e a utilização de um elemento com potencial de ionização inferior ao do analito, respectivamente. Em vista disso, tem-se disponível comercialmente uma solução denominada solução de Schinkel a qual contém Cs e La, para ser utilizada na determinação de elementos com baixo potencial de ionização, como Na e K e, elementos formadores de compostos pouco solúveis, como Ca e Mg.⁴⁹

Além dessas interferências, tem-se as interferências por fenômenos de transporte da amostra até o atomizador, devido ao alto teor de sal nas amostras de águas de produção que podem ocasionar diferenças na viscosidade, densidade, variações na formação do aerossol

e transporte deste até a chama. Essas interferências de matriz podem ser contornadas pela diluição das amostras ou até mesmo pela utilização de calibração por adição padrão.⁴⁹

Apesar das interferências descritas acima, a utilização da técnica de F AAS é adequada para a determinação monoelementar de elementos em concentrações na faixa de mg L^{-1} nos mais diversos tipos de amostras, além de apresentar vantagens como o uso de equipamentos simples, com menor custo de instalação e operação, boa precisão em virtude da boa robustez da técnica e a menor exigência de um operador habilidoso para obter resultados satisfatórios.

2.3.2 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado tem sido amplamente utilizada para a determinação de metais em diversas áreas, como na indústria, metalurgia, biologia, agricultura, meio ambiente, entre outras.⁵⁰

Similarmente à técnica de AAS, esta técnica de determinação está baseada na formação de átomos (e íons) no estado fundamental e gasoso. No entanto, ao contrário das técnicas de AAS, é feita a determinação da radiação emitida pelos átomos e íons no estado excitado ao retornarem para o estado fundamental. Em um equipamento de ICP-OES, o plasma de argônio é formado por uma tocha de quartzo, constituída por três tubos concêntricos. O plasma é um gás parcialmente ionizado, a altas temperaturas, contendo íons, elétrons e nêutrons, o qual é gerado pela aplicação de uma descarga elétrica, desencadeando a ionização do gás inerte, geralmente Ar. A temperatura que o plasma de Ar atinge pode variar de 5000 a 10.000 K, sendo mantida por aquecimento indutivo e a potência elétrica aplicada varia entre 1000 e 1500 W. O Ar parcialmente ionizado possui capacidade de ionizar quase todos os elementos químicos da tabela periódica, sendo então amplamente utilizado para a determinação multielementar.^{24,50}

A nebulização pneumática é o sistema de introdução de amostra mais comumente utilizado, onde a amostra em solução é succionada e posteriormente convertida em um aerossol sendo transportada até a câmara de nebulização, onde as gotículas maiores irão colidir com as paredes da câmara e irão condensar e, apenas as gotículas com diâmetros menores irão ser transportadas até o plasma e sofrer todos os processos de dessolvatação, vaporização e ionização a zona analítica do plasma.⁵⁰

Dentre as vantagens da técnica, destaca-se a baixa susceptibilidade a interferências químicas que é o resultado direto de suas altas temperaturas, a alta velocidade de análise,

capacidade de determinação multi-elementar, boa sensibilidade, ou seja, fornece LOQs baixos, em níveis de ppb, melhores LOQs quando comparado com a F AAS.^{24,50}

Algumas interferências espectrais podem ocorrer durante a etapa de determinação dos analitos, como por sobreposição de linhas espectrais, sobreposição parcial de linhas espectrais e presença de *background* contínuo. Entretanto, podem ser corrigidas pela utilização de uma linha espectral secundária, pela utilização de ferramentas matemáticas e medição do *background* em ambos os lados.⁵⁰

A ocorrência de interferências não espectrais pode ser devido aos efeitos no transporte do aerossol (diferenças na densidade e viscosidade das soluções), efeitos de ionização onde ocorrem devido a mudanças nas características do plasma em virtude da presença de sais (como Na e K) e solventes orgânicos. Além disso, altas concentrações de carbono podem causar a deposição de carbono na tocha e no tubo injetor, instabilidade do plasma ou até a extinção do mesmo, proporcionando perda de sensibilidade, piora nos limites de detecção e supressão do sinal analítico. A correção destas interferências pode ser através de um ajuste de matriz, calibração com adição do analito e através do uso de IS.^{10,50-52}

O uso do padrão interno é aconselhado para amostras que possuem diferenças na sua composição, na viscosidade, na concentração ácida, diferenças cujos efeitos possam ocasionar mudanças na eficiência de transporte da amostra até o plasma, sendo a diluição destas amostras improvável em virtude da baixa concentração dos analitos presentes. O padrão interno é adicionado em todas as soluções, inclusive na curva de calibração, contento a mesma concentração final em todas. Este baseia-se na ideia de que a variação na intensidade do padrão interno serve como um fator de correção para todos os elementos de interesse.⁵⁰ Penha *et al.*⁴⁸ avaliou o uso de padrão interno para a determinação de metais em amostras de águas de produção após a MW-AD. Neste trabalho, os autores observaram que para Co, Cr, Fe, Mn e V, melhores resultados foram obtidos com a utilização de Sc usado como padrão interno. Enquanto que para Se, melhores resultados foram obtidos utilizando Y como padrão interno. Para Ni, os autores observaram que não há a necessidade de utilização de padrão interno.

Apesar das interferências descritas acima, a utilização da técnica de ICP-OES destaca-se por possuir vantagens como alta velocidade de análise por ser uma técnica multi-elementar, alta sensibilidade, ou seja, fornece LOQs mais baixos quando comparado com o F AAS.

Apesar das suas vantagens, é improvável que a técnica de ICP-OES venha a substituir completamente a técnica de F AAS, uma vez que essas duas técnicas são complementares. Entre as vantagens da utilização da F AAS estão a maior simplicidade, menor custo e maior robustez quando comparado à ICP-OES.

2.4 PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Em virtude da complexidade da matriz das águas de produção e dos efeitos indesejáveis de vários constituintes presentes nessas amostras, torna-se de grande importância desenvolver métodos alternativos para o tratamento dessas águas para que se tomem medidas adequadas frente aos riscos ambientais, quando descartadas no meio ambiente ou principalmente para que esse efluente seja reutilizado para a reinjeção em poços de extração de petróleo com escassez de água.³

Flotadores, coalescedores, hidrociclones e filtros são, atualmente, os principais equipamentos utilizados no tratamento das águas de produção para a remoção de sólidos em suspensão, óleos disperso, biomassa bacteriana, hidrocarbonetos voláteis e gases corrosivos, como CO₂ e H₂S. Além disso, alguns produtos químicos podem ser adicionados ao processo de tratamento para melhorar a eficiência da separação de óleo/gás/água. Embora esses métodos de remoção de sólidos em suspensão, óleos dispersos e compostos voláteis sejam adequados, infelizmente estes métodos ainda são ineficientes na remoção de orgânicos dissolvidos e íons.³

Em vista disso, algumas tecnologias voltadas para a remoção de metais pesados em diversos tipos de efluentes já são comumente utilizadas, como a precipitação química, oxidação e redução, filtração, troca-iônica, osmose reversa, evaporação e tratamento eletroquímico.^{7,8,53} Contudo, estas tecnologias podem levar a algumas desvantagens como a produção de contaminantes secundários, a remoção incompleta de alguns metais, a um alto gasto de energia e a um alto custo de operação. Por isso, métodos alternativos têm sido propostos nos últimos anos com o objetivo de garantir uma melhoria no tratamento das águas de produção, principalmente para que esse efluente possa ser reinjetado nos poços de extração para facilitar o escoamento de petróleo.^{1,3,9}

Diante disso, recentemente, as técnicas biológicas têm se mostrado eficazes para o tratamento de efluentes tendo em vista que micro-organismos como leveduras, algas, bactérias e vírus possuem capacidade de adsorver, absorver e degradar diferentes compostos. Além disso, dentre as vantagens da utilização desses métodos biológicos,

destacam-se a facilidade de aplicação, manutenção e o baixo impacto ambiental, uma vez que esses métodos resultam na pouca geração de resíduos.⁹

No que diz respeito a utilização desses micro-organismos, as bactérias e leveduras são conhecidas como efetivos sorventes de metais em solução devido à grande área superficial das mesmas por unidade de peso.⁹ Todos esses aspectos, demonstram que provavelmente a presença de grupamentos carboxilatos e fosfatos na parede celular das bactérias sejam responsáveis pela eficiência desses micro-organismos na adsorção seletiva de alguns metais.^{54,55}

Dentre alguns mecanismos envolvidos nos processos de interação de micro-organismos e metais, pode-se destacar a ligação de metais a corpos extracelulares que possibilitam capturar e impedir a entrada de íons indesejáveis na célula, a associação de metais a grupos funcionais aderidos à superfície da parede celular e a presença de grupos sulfidril, carboxil, hidroxil, sulfato, amino, amido e fosfato, os quais estão envolvidos na captura e na forte interação com íons catiônicos.⁵⁶ Alguns principais mecanismos de interação dos micro-organismos com os metais estão exemplificados na Figura 2.

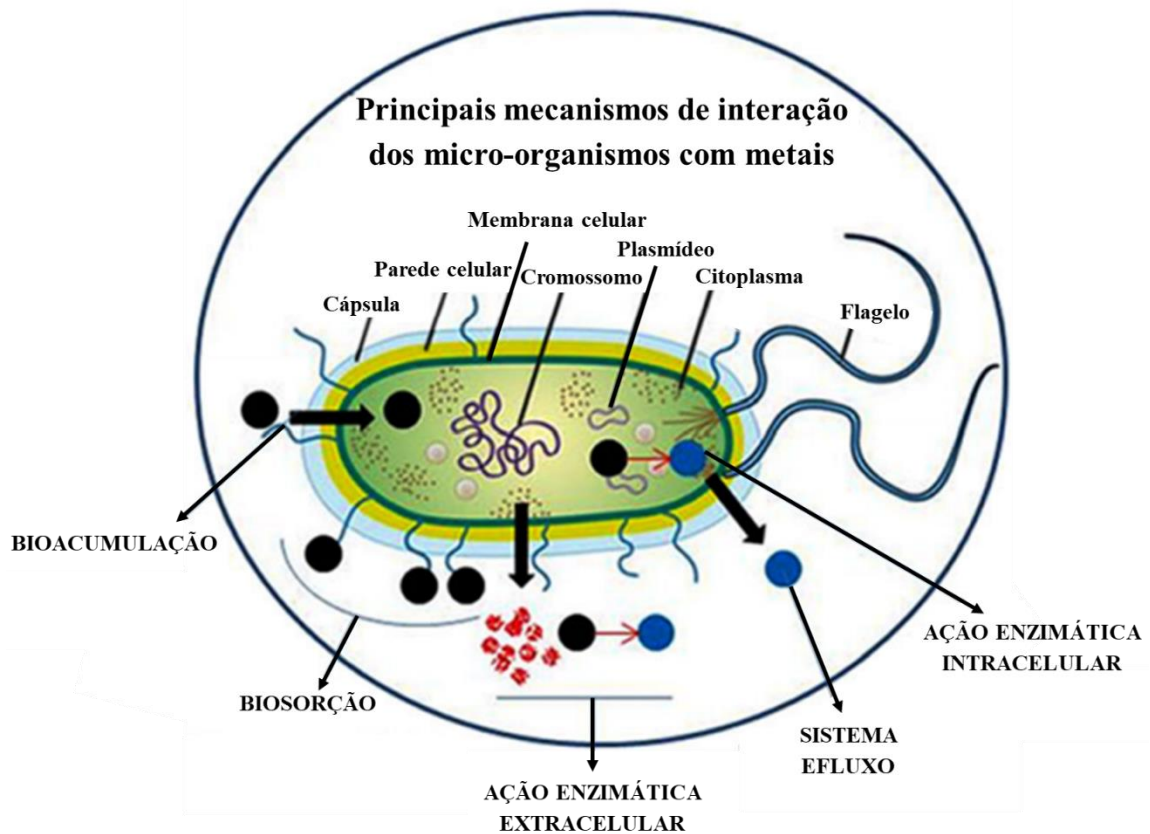


Figura 2. Principais mecanismos de interação dos micro-organismos com os metais. Adaptado de Alencar *et al*⁵⁷.

A interação do micro-organismo com o metal também pode ocorrer pelo processo de internalização, onde os transportadores de membrana e bombas de fluxo internalizam alguns metais presentes no meio extracelular devido à similaridade dos íons e pressão osmótica. Esse processo de internalização possui grande aplicação para a remoção de metais em solução, uma vez que a interação é forte e possibilita a remoção do metal pela precipitação da biomassa bacteriana. O processo de internalização está mostrado abaixo na Figura 3.⁵⁸

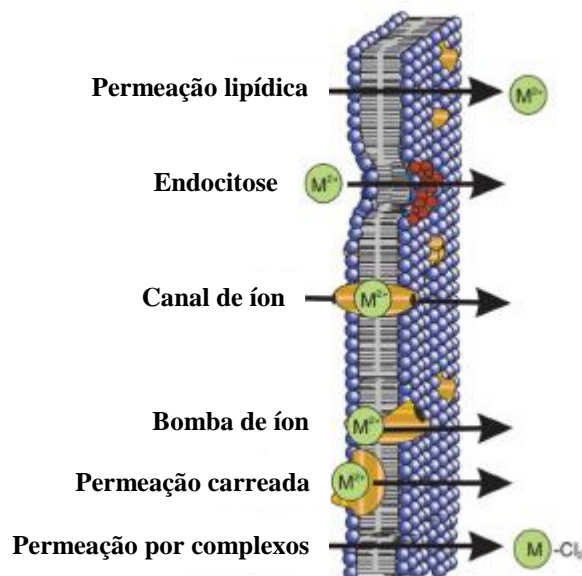


Figura 3. Mecanismos de permeação de metais em camadas lipídicas. Representado por M^{2+} ou M , os metais, dependendo da condição do elemento, podem ser transportados por vias dependentes de adenosina trifosfato (permeação carregada e bomba de íon) ou por meios não dependentes de adenosina trifosfato (permeação lipídica). Adaptado de Simkiss.⁵⁸

Em vista da exposição frente a alguns metais, os micro-organismos apresentaram formas consideráveis de resistência o que incentivou a necessidade por conhecer melhor os mecanismos de defesa das espécies capazes de tolerar condições estressantes de metais e até mesmo tóxicas. Essa exposição possibilitou a seleção e a evolução de marcas moleculares e fisiológicas determinantes para a sobrevivência de gêneros e espécies em diferentes meios e impulsionou a utilização das técnicas biológicas para a remoção de metais em diversos efluentes.⁵⁹

Com isso, nos últimos anos houve um aumento nos trabalhos publicados na literatura utilizando estes métodos biológicos, também chamados de processos de biorremediação, principalmente para remoção de compostos orgânicos e metais pesados.^{53,60-64} A presença de metais pesados em efluentes industriais traz uma série de problemas ambientais e de saúde. Com isso, alguns trabalhos publicados na literatura utilizando processos de biorremediação em soluções sintéticas, água salgada, solo industrial e água doce foram encontrados, os quais são descritos a seguir. Cabe salientar que não foram encontrados trabalhos publicados na literatura que visam a utilização de processos de biorremediação

em amostras de águas de produção provenientes da extração de petróleo contendo altos teores de óleos e graxas e metais.

Mullen *et al.*⁶³ investigou os micro-organismos: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* quanto à capacidade de remover Ag, Cd, Cu e La em solução aquosa sintética contendo 1 mmol L⁻¹ dos analitos. Foi constatado neste trabalho que a *P. Aeruginosa* foi o micro-organismo que apresentou resultados mais eficientes na remoção de todos os metais estudados, enquanto que *B. cereus* apresentou resultados menos eficientes. Para a remoção apenas de Cu, *B. subtilis* foi o micro-organismo que removeu a maior quantidade enquanto que para Cd, o micro-organismo que promoveu a maior remoção foi *E. coli*. Através dos resultados obtidos, as remoções para Ag, Cd, Cu e La foram de 89, 12, 29 e 27%, respectivamente. Estas remoções foram alcançadas em pH 4,00 e após 2 h de interação a 5 °C. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi feita e indicou que o La se acumulou nas paredes celulares independente do gênero e da espécie do micro-organismo como precipitados cristalinos e a Ag também se acumulou nas paredes celulares, entretanto como agregados coloidais. As imagens obtidas para Cd e Cu não forneceram respostas suficientes para identificar a localização da sorção desses elementos nos micro-organismos e também foi observado pouca diferença na sorção desses analitos em relação a cada um dos micro-organismos estudados neste trabalho. Com os resultados de remoção obtidos, os autores concluíram que as células bacterianas são capazes de ligar grandes quantidades de metais diferentes.⁶³

Em outro trabalho, Matsunaga *et al.*⁶⁰ avaliou a utilização de microalgas marinhas com o objetivo de avaliar a remoção de Cd em amostras de água salgada (2% NaCl) contaminadas. Neste trabalho, foi possível obter 24 linhagens que foram tolerantes às concentrações de Cd possuindo capacidade de biorremediação deste metal, sendo 19 algas verdes e 5 cianobactérias capazes de reter mais de 10% do total de Cd inicialmente medido no meio. A *Chlorella sp.* foi a mais efetiva, resultando em uma remoção de 48,7% do total de Cd. Além de avaliar o potencial de remoção, os autores ainda constataram que 67% do Cd removido foi acumulado intracelularmente, enquanto 25% sofreu adsorção superficial nos organismos testados.⁶⁰

Em outro trabalho⁶¹, foi avaliada a capacidade da *Spirulina platensis* em remover o Cr⁶⁺ utilizando bio-sorção passiva em soluções sintéticas contendo Cr⁶⁺. A biomassa de microalgas inativa e soluções sintéticas contendo Cr⁶⁺ foram utilizadas para avaliar fatores importantes no processo e na capacidade de bio-sorção. Os resultados obtidos pelos autores

mostraram que as microalgas têm potencial para bioadsorção de Cr^{6+} , atingindo remoção de $100,39 \text{ mg g}^{-1}$ durante os primeiros 10 min de ensaio. Além disso, concluiu-se que o pH foi o parâmetro de maior influência no processo, sendo que, com o valor de pH igual a 3,0 houve uma remoção de 61,97% de Cr^{6+} presente na solução.⁶¹

Desaunay *and* Martins⁶⁵ avaliaram a adsorção de Cd na parede celular e internalização pela *Cupriavidus metallidurans* CH34 em soluções sintéticas contendo Cd. Para isso, foi avaliada a concentração de Cd que estava adsorvido na parede celular utilizando um método de lavagem da biomassa com EDTA. Para avaliar a concentração de Cd internalizado nas células, foram feitos comprimidos com a biomassa bacteriana centrifugada após os ensaios de interação e, em seguida, foi utilizado um método de ruptura de células baseado na prensagem dos comprimidos. A lavagem com EDTA não foi adequada para determinar a distribuição de Cd nas células bacterianas devido a impossibilidade de realizar lavagens menores que 2 min, a fim de evitar a desestabilização da membrana celular. Por outro lado, o método baseado na ruptura das células mostrou-se adequado para essa avaliação. Foi observado que, aproximadamente 80% de Cd sorvido pela bactéria estava internalizado no citoplasma.⁶⁵

Em um outro estudo, Arivalagan *et al.*⁶⁶ isolaram uma linhagem bacteriana KTSMBNL 43 a partir de um solo industrial. Esse micro-organismo isolado foi identificado molecularmente por sequenciamento de DNA como *Bacillus cereus*. Neste trabalho, os autores avaliaram a bioadsorção de Cd pelo micro-organismo isolado e, para a interação do analito com o micro-organismo, alguns parâmetros foram avaliados como pH, temperatura, concentração inicial de Cd e tempo de interação. A remoção máxima de Cd pelo micro-organismo foi de 82% em pH 6,00 e temperatura de 35 °C, com concentração inicial de Cd de 200 mg L^{-1} . Os autores concluíram que o *B. cereus* é adequado para ser usado nos processos de biorremediação para a remoção de Cd em solos industriais poluídos.⁶⁶

Com relação à utilização de micro-organismos em processos de biorremediação, Dadrasnia *et al.*⁶² investigou a capacidade de bioadsorção de células de *Bacillus salmalaya* 139SI para Cr^{6+} em soluções aquosas. Vários parâmetros analíticos foram avaliados a fim de se obter a condição ótima para a bioadsorção, como concentração inicial de Cr^{6+} , pH e tempo de interação. Tanto as células vivas e mortas foram adequadas para a bioadsorção de Cr^{6+} , sendo que a capacidade máxima foi de $20,35 \text{ mg g}^{-1}$ à 25 °C, com pH 3,0 e tempo de interação de 50 min. MEV e o infravermelho por transformada de Fourier indicaram influência significativa das células mortas na bioadsorção de Cr^{6+} com base em alterações

morfológicas celulares. Foram alcançadas eficiências de dessorção de aproximadamente 92% e 70% usando células mortas e vivas, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram a alta capacidade de adsorção de biomassa morta de *B. salmalaya* 139SI no processo de bioadsorção, ou seja, demonstrou que o metal acumula-se na parede celular do micro-organismo e não intracelularmente.⁶²

Ozdemir *et al.*⁶⁷ investigou a bioacumulação, a resistência e a pré-concentração de U por *Bacillus vallismortis*. Esse micro-organismo foi resistente e o crescimento não foi significativamente afetado na presença de concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ de U até 72h. Ainda, os autores imobilizaram o *B. vallismortis* em nanotubos de carbono para aumentar a remoção do analito e, esta imobilização foi eficaz. Este método desenvolvido foi adequado para a aplicação nos processos de biorremediação para a remoção de U nas amostras de águas do lago Van, na Turquia.

Al-Gheethi *et al.*⁶⁸ estudou a remoção de metais pesados pelo micro-organismo *B. subtilis*. Para isso, foram investigados os pré-tratamentos de células de *B. subtilis* por SC-CO₂ utilizando CO₂ pressurizado, autoclavação a vapor e células vivas não tratadas, para avaliar se havia melhora na remoção dos metais pesados. Alguns parâmetros de interação foram avaliados, como a concentração de micro-organismo, pH, tempo e temperatura. A eficiência de remoção para Ni foi 98,5, 99,2 e 96,3% para as células de *B. subtilis* por SC-CO₂, autoclavação a vapor e células vivas não tratadas, respectivamente. Os autores concluíram que o pré-tratamento por SC-CO₂ apresentou melhores remoções para Ni, Cu, Zn, Pb e Cd do que os demais pré-tratamentos, o que evidencia a melhora no processo de remoção desses analitos em comparação com células vivas não tratadas.⁶⁸

Os processos de tratamento envolvendo micro-organismos são de grande relevância não somente pela facilidade da aplicação e manutenção, mas também pelo menor custo associado, eficiência e baixo impacto ambiental, com pouca geração de resíduos.⁶⁹ Desta forma, o uso de micro-organismos pode ser considerado uma alternativa promissora para a remoção de metais de diferentes matrizes.

Cabe destacar que são escassos os trabalhos na literatura utilizando processos de biorremediação para a remoção de metais em diversas amostras e, principalmente, salienta-se que não foram encontrados trabalhos que utilizem esses processos visando a remoção de metais como Ba, Ca, Fe, Mg e Sr em amostras de águas de produção provenientes da extração de petróleo. A utilização de micro-organismos para a remoção de metais pesados vem sendo muito atrativa em vista da capacidade dos micro-organismos em resistir ao estresse ambiental, por meio de mutações e rápida capacidade de evolução.⁶⁴

3. OBJETIVO

Este trabalho possui dois objetivos principais, tais como i) o desenvolvimento de metodologia analítica para o preparo de amostra de águas de produção visando a posterior determinação de metais e após, ii) efetuar a remoção de alguns destes metais utilizando processos de biorremediação. A presença de alguns metais nestas amostras, como Ba, Ca, Fe, Mg e Sr, pode ocasionar a formação de compostos pouco solúveis causando incrustações e entupimentos nas tubulações durante a extração do petróleo. Com isso, o desenvolvimento de processos de biorremediação que possui baixo custo e que possa ser aplicado como pré-tratamento com facilidade nestas águas de produção é de grande vantagem econômica e ambiental.

Como objetivos específicos destacam-se:

- 1) Investigar os métodos de preparo de amostras baseados na decomposição assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) e na decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV) para tratamento de águas de produção;
- 2) Efetuar a determinação de metais por ICP-OES nas amostras de águas de produção após o método de preparo de amostras otimizado;
- 3) Isolar micro-organismos presentes naturalmente nas amostras de águas de produção. Investigar a tolerância destes micro-organismos isolados frente adiferentes concentrações de metais;
- 4) Realizar a identificação molecular dos micro-organismos isolados e selecionados para os processos de biorremediação;
- 5) Investigar os principais parâmetros relacionados à interação dos micro-organismos com os metais, através de planejamento fatorial;
- 6) Avaliar a eficiência do processo de biorremediação para remoção de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr nas águas de produção usando os micro-organismos isolados das amostras.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

4.1.1 Equipamentos utilizados na etapa de preparo das amostras

Neste trabalho, foram avaliados dois métodos de preparo de amostras visando a posterior determinação de metais nas amostras de águas de produção obtidas a partir da extração do petróleo. Os métodos de decomposição avaliados foram a decomposição assistida por radiação micro-ondas e a decomposição assistida por radiação micro-ondas combinada a radiação ultravioleta. Para a decomposição das amostras foi utilizado um forno de micro-ondas Multiwave PRO (Anton Paar, Áustria), com software versão 2.42.7406.8. Este sistema permite a utilização de até oito frascos de quartzo de alta pressão (volume interno de 80 mL) e é equipado com rotor tipo 8NXQ 80. A pressão e a temperatura máximas permitidas pelo sistema são de 80 bar e 280 °C, respectivamente.

Quando a decomposição por MW-UV foi feita, foram utilizadas lâmpadas de cádmio de baixa pressão preenchidas com argônio, dentro de cada frasco de quartzo (*part. number* 16847, Anton Paar, Áustria). O comprimento de onda emitido pela lâmpada é predominantemente localizado na região UV, a 228 nm, e a intensidade de radiação UV emitida durante o procedimento de decomposição depende da energia de micro-ondas capturada pela antena e, varia de 1 a 10 W. A temperatura máxima foi limitada a 250 °C durante o procedimento por MW-UV para evitar danos aos dispositivos de PTFE que compõe o sistema, que possuem a função de posicionar a lâmpada de forma correta no interior do frasco a fim de evitar o contato direto da lâmpada com o frasco de quartzo.

Para avaliar a eficiência de decomposição dos métodos estudados, foi feita a determinação do TOC nas amostras originais e nas soluções finais após a decomposição das amostras. Para isso, foi utilizado um analisador Multi N/C 2100S (Analytik Jena, Alemanha) com detector de infravermelho (Focus Radiation NDIR Detector®) e equipado com auto amostrador AS60.

A determinação de acidez nas soluções decompostas foi feita por titulação em meio aquoso utilizando um titulador automático 905 Titrand (Methrom, Suíça) equipado com agitador automático (modelo 801 Stirrer), bureta de 20 mL (Dosino 800) e eletrodo de pH combinado (LL Unitrode, modelo 6.0258.600).

A pesagem das amostras foi feita em balança analítica (XS105, Mettler Toledo, EUA) com resolução de 0,00001 g e carga máxima de 120 g.

4.1.2 Determinação de metais por ICP-OES e F AAS

A determinação de Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, V e Zn foi feita utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Optima 2000 DV, Perkin Elmer, EUA), equipado com câmara de nebulização ciclônica (*Glass Expansion, Inc.*, Austrália), nebulizador GemCone, tocha e tubo injetor de quartzo (2 mm d.i.). Argônio com pureza superior a 99,996% (Oxisul, Brasil) foi utilizado como gás principal, auxiliar e de nebulização no equipamento de ICP-OES. As condições operacionais usadas para a determinação dos analitos estão mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições operacionais usadas para a determinação dos analitos por ICP-OES.

Parâmetro	Condições		
Potência da radiofrequência, W	1300		
Vazão do gás principal, L min ⁻¹	15		
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	0,20		
Vazão do gás de nebulização, L min ⁻¹	0,80		
Câmara de nebulização	Ciclônica		
Nebulizador	GemCone		
Vista do plasma	Axial		
Linha de emissão, nm	Ba - 455,403	Ca - 422,673	Cd - 214,440
	Co - 228,616	Cr - 267,716	Cu - 324,752
	Fe - 239,562	K - 766,490	Mg - 280,271
	Mn - 259,372	Na - 589,592	Ni - 231,604
	Pb - 220,353	Sr - 407,771	V - 290,880
	Zn - 206,200	*Sc - 361,383	

*Padrão interno

Após os ensaios de biorremediação para a remoção de Ca, Fe e Mg, a determinação destes elementos no sobrenadante assim como na biomassa de micro-organismos foi feita utilizando um espectrômetro de absorção atômica com chama (modelo AAnalyst 200, Perkin Elmer, EUA) equipado com lâmpada de deutério para correção de fundo.

Para a determinação de Fe, foi utilizada como fonte de radiação uma lâmpada de cátodo oco de Fe, operada a 15 mA, comprimento de onda selecionado de 248,33 nm e, 1,8 e 1,35 nm a largura e a altura da fenda espectral, respectivamente. Para a determinação

de Ca, foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco de Ca, operada a 15 mA, comprimento de onda selecionado de 422,67 nm e, 2,7 e 0,6 nm a largura e a altura da fenda espectral, respectivamente. Para a determinação de Mg, foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco de Mg, operada a 6 mA, comprimento de onda selecionado de 285,21 nm e, 2,7 e 1,05 nm a largura e a altura da fenda espectral, respectivamente.

Para a determinação de Ba e Sr após os ensaios de interação, foi utilizado o equipamento de ICP-OES, onde as condições operacionais usadas para a determinação desses analitos estão mostradas na Tabela 2.

4.1.3 Equipamentos utilizados no estudo com os micro-organismos

Durante o estudo de isolamento dos micro-organismos presentes nas águas de produção, dos testes de seleção e dos ensaios de biorremediação, foi utilizada uma cabine de segurança biológica (modelo 400, Pachane, Brasil), autoclave (modelo Vitale Plus, Cristófoli Biossegurança, Brasil) para esterilização dos materiais e soluções, agitador vortex (modelo S0200, Labnet International, EUA) e incubadora microbiológica (modelo B 6120, Thermo Electron Corporation, Alemanha) para crescimento de micro-organismos em meio sólido. Para o estudo de seleção dos micro-organismos e ensaios de biorremediação foi utilizado ainda, um agitador orbital (modelo Excella E25, New Brunswick, EUA) para crescimento dos micro-organismos em meio líquido. Nos estudos de tolerância frente a diferentes concentrações de metais foram utilizados também uma centrífuga (modelo 5424, Eppendorf AG, Alemanha) e um espectrofotômetro (modelo Biomate 3S, Thermo Scientific, Alemanha).

Para a identificação molecular por material genético foi utilizado um agitador com controle de temperatura (modelo 5355, Eppendorf AG, Alemanha), uma cuba de eletroforese (modelo Powerpac 300, Bio-Rad Laboratories, EUA), um transiluminador UV (modelo Universal Hood II, Bio-Rad Laboratories, EUA) e um termociclador (modelo ProFlex PCR System, Applied Biosystems, EUA). Para quantificação do material genético foi utilizado um fluorímetro (modelo Qubit 2.0, Invitrogen, EUA), colunas de purificação e uma plataforma de sequenciamento (modelo AS 3500XL Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific - Applied Biosystems, EUA).

O armazenamento dos micro-organismos durante todos os processos foi feito em geladeira com temperatura de aproximadamente 4 °C.

4.1.4 Outros equipamentos utilizados

Com o objetivo de efetuar uma pré-caracterização das amostras, foi feita a determinação do pH, cor, concentração de NaCl, TOC, sólidos totais e turbidez em quatro amostras de águas de produção obtidas a partir da extração do petróleo.

Para a determinação do pH foi utilizado um papel indicador de pH (Merck, Alemanha). A determinação de cor foi feita através da comparação das amostras originais com um disco de concentrações conhecidas de Pt e Co (Nessler Quanti 200, Policontrol, Brasil). A determinação de NaCl foi baseada na concentração de Cl presente nas amostras. Para isso, foi feita a determinação por cromatografia de íons utilizando um cromatógrafo equipado com um sistema de supressão química (modelo 850 Professional IC, Metrohm, Suíça), uma pré-coluna (modelo Metrosep A supp 4/5 Guard, 5 x 4 mm de diâmetro, 5 µm de diâmetro de partícula, Metrohm, Suíça), uma coluna de troca iônica com grupos de amônio quartenário suportados em poli(álcool vinílico) com 250 x 4 mm de d. i. e 5 µm de diâmetro de partícula (modelo Metrosep A Supp 5, Metrohm, Suíça) e um detector de condutividade. A fase móvel utilizada foi uma solução de Na₂CO₃ 3,2 mmol L⁻¹ e NaHCO₃ 1 mmol L⁻¹ com uma vazão de 0,7 mL min⁻¹, sendo usada uma alça de amostragem de 100 µL.

Para a determinação de sólidos totais foram utilizados cadinhos de Pt, previamente descontaminados com HNO₃ 10%, chapa de aquecimento (modelo MA239, Marconi, Brasil) e estufa (modelo 400-2ND 200 °C, Ethik Technology, Brasil). Para a determinação de turbidez foi utilizado um turbidímetro (modelo Ap-2000, Policontrol, Brasil).

4.2 AMOSTRAS, REAGENTES E SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA

Quatro amostras de águas de produção obtidas a partir da extração de petróleo, nomeadas por A, B, C e D foram utilizadas. A amostra B foi escolhida para a otimização do método MW-UV devido à maior quantidade de amostra disponível para os experimentos. As amostras de águas de produção A, B e C são oriundas da cidade de São Mateus no Espírito Santo, ambas provenientes da mesma plataforma *onshore*, entretanto coletadas em diferentes unidades nesta plataforma. A amostra de água de produção de petróleo nomeada por D foi coletada na cidade de Sergipe.

Para o preparo de soluções, foi utilizada água ultrapura, a qual passou por um processo de destilação e deionização em uma coluna de troca iônica e, posteriormente, purificada em um sistema Milli-Q (modelo Milli-Q, Millipore, EUA) com resistividade mínima de 18,2 MΩ cm a 25 °C. O ácido nítrico concentrado (Merck, Alemanha) utilizado

na decomposição das amostras foi previamente purificado em sistema *sub-boiling* (modelo Distillacid BSB-939-IR, Berghof, Alemanha). Peróxido de hidrogênio (30%, Synth, Brasil) foi utilizado como reagente auxiliar.

Para as determinações de TOC, as soluções de calibração do analisador foram preparadas a partir da dissolução de hidrogenoftalato de potássio (Synth, Brasil) em água, na faixa de 0,5 a 20 mg L⁻¹ de C. Para a determinação da acidez residual, uma solução de hidróxido de potássio (Vetec, Brasil) 0,1 mol L⁻¹ foi preparada, sendo previamente padronizada com hidrogenoftalato de potássio (Synth, Brasil).

Para a calibração em baixas concentrações no equipamento de ICP-OES, as soluções de referência foram preparadas a partir da diluição sequencial de uma solução estoque multielementar contendo 10 mg L⁻¹ dos analitos (Plasma Cal SCP33MS, SCP Science, Canadá) em HNO₃ 5% (v/v). A calibração do equipamento foi feita na faixa de 10 a 100 µg L⁻¹. Para a calibração em altas concentrações, as soluções de referência foram preparadas a partir da diluição sequencial de uma solução estoque multielementar contendo 1000 mg L⁻¹ dos analitos (ICP Multi-element standard solution IV, Merck, Alemanha) em HNO₃ 5% (v/v). A calibração do equipamento foi feita na faixa de 0,5 a 20 mg L⁻¹. Ítrio (1000 mg L⁻¹, SCP Science, Canadá) e Sc (1000 mg L⁻¹, SCP Science, Canadá) foram utilizados como padrão interno para a determinação dos analitos na concentração final de 1 mg L⁻¹.

A avaliação da exatidão do método MW-UV foi feita através da decomposição de CRM (SCP Science EP-H-3 *drinking water high*, Canadá) e, através de experimentos com fortificação de analito. A fortificação dos analitos foi feita pela adição de uma concentração conhecida de solução de referência (Plasma Cal SCP33MS, SCP Science, Canadá) para os analitos em baixas concentrações na ordem de µg L⁻¹ e (ICP Multi-element standard solution IV, Merck, Alemanha) para os analitos em altas concentrações na ordem de mg L⁻¹, diretamente nas amostras, ou seja, antes da etapa de preparo de amostras.

Para o crescimento e desenvolvimento dos micro-organismos foram preparados meios nutritivos ricos Luria-Bertani (LB, composição: 10 g L⁻¹ triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g L⁻¹ de NaCl) e Sabouraud (Sb, composição: 20 g L⁻¹ de glicose e 10 g L⁻¹ de NaCl) (Sigma-Aldrich, EUA), onde o preparo foi feito pela dissolução desses meios em água. Para utilizar o meio sólido foi adicionado aos meios de cultivo, 20 g L⁻¹ de ágar (Sigma-Aldrich, EUA). *B. subtilis* ATCC® 6633 VITROIDS 10000 UFC (unidades formadoras de colônia) (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado como micro-organismo de referência para os ensaios de interação com os metais onde o meio

utilizado foi 0,5% de glicose (Sigma-Aldrich, EUA) e 0,1% NH_4NO_3 (Merck, Alemanha). Sais de FeCl_3 hexahidratado (Synth, Brasil), CaCl_2 anidro (Merck, Alemanha), MgCl_2 hexahidratado (Synth, Brasil), BaCl_2 (Synth, Brasil) e SrCl_2 hexahidratado (Synth, Brasil) foram utilizados para os ensaios de interação da bactéria com o metal.

Para a calibração no equipamento de F AAS para a determinação de Ca, Fe e Mg, as soluções de referência foram preparadas a partir da diluição sequencial de uma solução monoelementar estoque preparada a partir dos sais de CaCl_2 anidro, FeCl_3 hexahidratado e MgCl_2 hexahidratado contendo 1000 mg L^{-1} em HNO_3 2% (v/v). A calibração do equipamento foi feita na faixa de 1 a 5 mg L^{-1} para Ca, 1 a 4 mg L^{-1} para Fe e 0,15 a $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ para Mg.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Métodos de preparo de amostras para águas de produção provenientes da extração do petróleo

Neste trabalho, foram investigados dois métodos de decomposição para o preparo das águas de produção visando a posterior determinação de metais. Os procedimentos utilizados para cada método estão descritos a seguir. Cabe destacar que a otimização do método de MW-UV foi feita para a amostra B e posteriormente, as melhores condições foram aplicadas para o tratamento de todas as amostras. O método MW-AD foi aplicado para todas as amostras de águas de produção usando condições similares às que foram otimizadas para o método de MW-UV. Na Figura 4 é apresentado um fluxograma no qual estão esquematizados os procedimentos utilizados e os parâmetros avaliados.

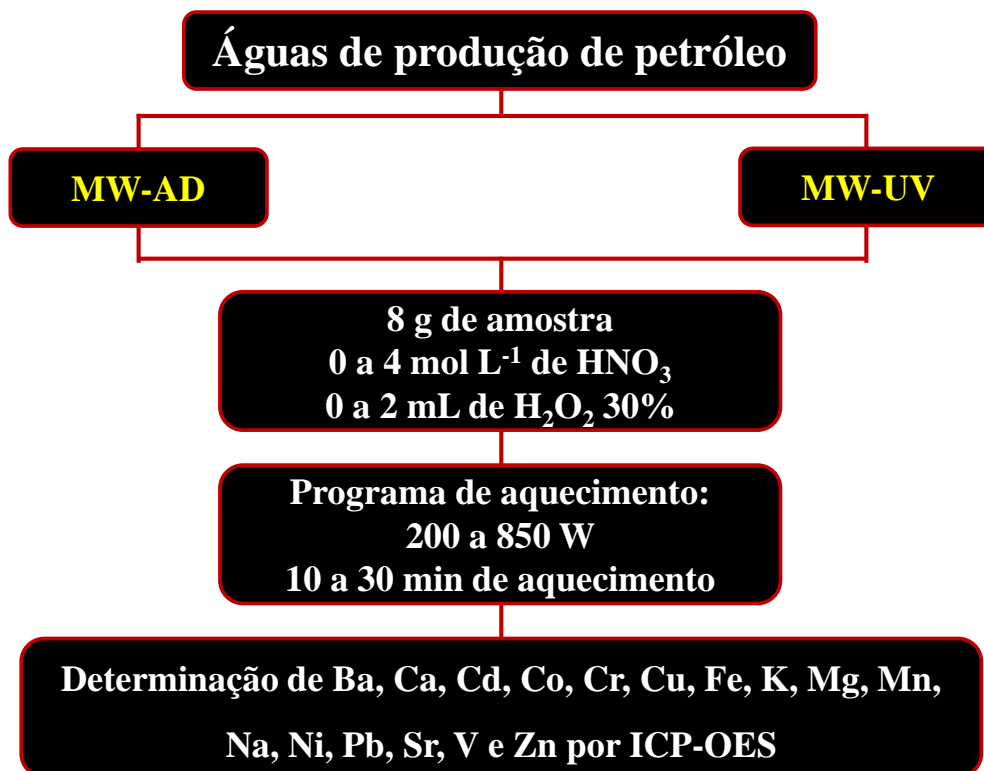


Figura 4. Parâmetros avaliados para a decomposição de águas de produção de petróleo e posterior determinação de metais por ICP-OES.

4.3.1.1 Decomposição assistida por radiação micro-ondas combinada a radiação ultravioleta (MW-UV)

Na decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta foram avaliados alguns parâmetros, tais como, concentração de HNO_3 , volume de H_2O_2 e programa de aquecimento. Massas de 8g de águas de produção foram pesadas e transferidas diretamente para frascos de quartzo, juntamente com $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 e $0,4 \text{ mL}$ de H_2O_2 . Após a adição dos reagentes, os dispositivos de PTFE e as lâmpadas de UV foram posicionados dentro dos frascos, que foram fechados. O rotor contendo os frascos foi posicionado no interior da cavidade do forno de micro-ondas e, o programa de aquecimento foi iniciado. O programa de aquecimento foi investigado variando a potência da radiação micro-ondas e o tempo de aquecimento. O programa otimizado foi de 700 W por 15 min (5 min de rampa) e, 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). A temperatura e a pressão máximas do sistema foram ajustadas em $250 \text{ }^\circ\text{C}$ e 80 bar , respectivamente.

Após a decomposição, os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos e diluídos a 25 mL com água ultrapura. Os frascos, as lâmpadas UV e os dispositivos de PTFE, utilizados na decomposição, foram descontaminados com

8 mL de HNO₃ concentrado sob aquecimento por radiação micro-ondas por 15 min a 900 W. Os experimentos foram feitos em triplicata.

4.3.1.2 Decomposição assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)

A decomposição assistida por radiação micro-ondas foi feita com o objetivo de comparar a eficiência de decomposição com o método proposto (MW-UV). As amostras de águas de produção foram pesadas e transferidas diretamente para os frascos de quartzo, sem a utilização das lâmpadas de UV e dos dispositivos de PTFE. As condições utilizadas foram similares quando foi feita a decomposição por MW-UV, 8 g de amostra, 0,8 mol L⁻¹ de HNO₃ e 0,4 mL de H₂O₂. O programa de aquecimento foi de 700 W por 15 min (5 min de rampa) e, 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). A temperatura e a pressão máximas foram ajustadas em 280 °C e 80 bar, respectivamente. Os experimentos foram feitos em triplicata.

4.3.2 Determinação de C e acidez

Com o objetivo de avaliar a eficiência de decomposição dos métodos MW-UV e MW-AD foi feita a determinação do TOC nas soluções finais utilizando um analisador elementar de C. Para remover o carbono inorgânico dissolvido antes da determinação de C, as amostras foram previamente acidificadas com 0,01 mol L⁻¹ de HCl e foi feita uma purga com O₂ durante 3 min. A temperatura do forno para a queima da amostra foi de 850 °C.

Para a determinação da acidez, primeiramente foi feita a dissolução do KOH em água a fim de se preparar uma solução de concentração final aproximadamente 0,1 mol L⁻¹. Esta solução foi posteriormente padronizada com padrão primário de biftalato de potássio. Após a padronização, procedeu-se a titulação das amostras.

4.3.3 Determinação dos analitos por ICP-OES e por F AAS

Para verificar a aplicabilidade do método proposto por MW-UV, após a decomposição das amostras de águas de produção foi feita a determinação de metais por ICP-OES nos digeridos. Foi utilizada uma solução de Sc na concentração final de 1 mg L⁻¹ como padrão interno. Os valores encontrados para Ba, Ca, Fe, Mg e Sr foram usados como referência para os estudos posteriores de remoção de metais por micro-organismos.

Para verificar a eficiência do processo de biorremediação usando os micro-organismos selecionados, foram feitas determinações de Ca, Fe e Mg por F AAS após os ensaios de interação, tanto no sobrenadante, como nas soluções de lavagem e nas soluções após a decomposição da biomassa. Para a determinação de Ca e Mg foi utilizada solução de Schinkel, tanto para as soluções de referência usadas para a calibração do equipamento quanto para os brancos e soluções obtidos após a interação dos micro-organismos. Esta solução é composta por CsCl 1% (m/v) e LaCl₃ 10% (m/v), utilizados como supressor de ionização e formador de óxidos, respectivamente.

Para verificar a eficiência do processo de biorremediação para a remoção de Ba e Sr foram feitas as determinações por ICP-OES após os ensaios de interação, tanto no sobrenadante, como nas soluções de lavagem e nas soluções após a decomposição da biomassa. As condições utilizadas foram descritas anteriormente.

4.3.4 Avaliação da exatidão do método MW-UV

A avaliação da exatidão do método de MW-UV foi feita através da decomposição de CRM com matriz semelhante às amostras. Para isso, o CRM (EP-H-3 *drinking water high*) foi decomposto nas condições otimizadas que foram aplicadas as amostras (0,8 mol L⁻¹ de HNO₃ e 0,4 mL de H₂O₂) e, posterior a decomposição, foi feita a determinação de Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, V e Zn por ICP-OES. Além disso, a avaliação da exatidão do método foi feita também através da fortificação dos analitos nas amostras, onde uma solução multielementar de concentração conhecida foi adicionada as amostras antes da etapa de decomposição por MW-UV.

4.3.5 Estudo com os micro-organismos

4.3.5.1 Isolamento dos micro-organismos presentes nas águas de produção

Primeiramente, foi feito o isolamento de micro-organismos que estão presentes naturalmente nas amostras de águas de produção selecionadas. Para isso, foi feito o inóculo das amostras em meio de cultivo próprio para crescimento geral (Luria Bertani, LB). As quatro amostras de águas de produção disponíveis para realização deste trabalho, nomeadas por A, B, C e D, foram utilizadas. Uma alíquota de 50 mL de cada amostra foi filtrada em membrana Millipore 0,22 µm e o material retido foi ressuspensionado em 500 µL de água ultrapura. A solução obtida da ressuspensão, denominada concentrada, foi diluída em séries de 100 e 1000 vezes devido à alta concentração de material retido. Alíquotas de 50 µL da solução concentrada e das diluições foram pipetadas e, espalhadas

com o auxílio de uma alça de Drigalski, em meios sólidos LB e Sabouraud (Sb), previamente autoclavados a 1 bar e 120 °C e vertidos em placas de Petri, para crescimento de bactérias e fungos, respectivamente. Os cultivos foram mantidos a 30 °C por 24 h e, devido ao crescimento de diferentes micro-organismos (visualmente detectados) em uma mesma placa, foi feito um isolamento das colônias morfológicamente diferentes. Para isso, com o auxílio de uma alça de platina estéril, as diferentes colônias foram coletadas e, em seguida, foram semeadas em novas placas de meio LB e Sb sólido. As placas foram mantidas a 30 °C por 24 h. Os isolamentos foram repetidos até que se obtivessem culturas de micro-organismos puras, sem contaminações visíveis. Para isso, o isolamento foi feito pela técnica de esgotamento, onde é possível separar o micro-organismo de interesse da contaminação.

4.3.5.2 Seleção dos micro-organismos por tolerância aos metais em meio nutritivo e em meio mínimo

Considerando o objetivo da utilização dos micro-organismos isolados para a remoção de metais por contato direto entre célula e metal, foi feita uma seleção em virtude da tolerância desses micro-organismos isolados frente a diferentes concentrações de Ba, Ca, Fe e Sr. Para isso, placas de meio de cultura LB e Sb, contendo 40 mg L⁻¹ de Ba, 40 mg L⁻¹ Fe, 140 mg L⁻¹ de Sr e 3500mg L⁻¹ de Ca, foram feitas. As concentrações dos elementos foram adicionadas nos meios de cultura ainda líquidos e foi feita a homogeneização. Após a geleificação dos meios de cultura contendo os metais nas placas de Petri, estas foram semeadas com os diferentes micro-organismos isolados. O perfil de desenvolvimento das colônias foi observado a cada 24 h por 4 dias.

Outra seleção para tolerância dos isolados frente às condições encontradas nas águas de produção foi feita. Devido a pouca disponibilidade de fontes de C para o desenvolvimento de micro-organismos em águas de produção, foi utilizado um meio pobre, constituído por 0,5% de glicose e 0,1% de NH₄NO₃. Neste experimento, foram utilizados apenas os micro-organismos selecionados na primeira etapa, ou seja, os isolados que não apresentaram crescimento de colônias em meio LB ou Sb foram descartados. O perfil de desenvolvimento das colônias foi observado a cada 24 h por 4 dias. Destaca-se que foram feitos brancos analíticos desses ensaios, os quais se caracterizaram por não conter concentrações dos metais e nestes, também foram semados os diferentes micro-organismos.

4.3.5.3 Identificação molecular por sequenciamento de DNA

Para a extração de ácidos nucleicos totais dos isolados tolerantes aos metais, os mesmos foram cultivados em meio LB (e/ou Sb) com agitação de 200 rpm a 30 °C por 24 h em erlenmeyers de 250 mL. Alíquotas de 2 mL dos cultivos foram recuperadas e centrifugadas (14000 rpm por 10 minutos), sendo o sobrenadante descartado e o pellet lavado com água destilada estéril. A extração de ácidos nucleicos foi realizada adaptando o protocolo estabelecido por Green, M. R. e Sambrook, J.⁷⁰, empregando pérolas de vidro e fenol-clorofórmio. Para a remoção de RNAs, as amostras foram tratadas com RNase (1 µL de uma solução de 100 µg µL⁻¹), sendo então incubadas a 37 °C por 1 hora. A fim de avaliar a qualidade da extração de DNA resultante, eletroforese em gel de agarose 0,8% foi utilizada. As amostras foram armazenadas a -20 °C até a sua utilização.

Para a obtenção da região de DNA específica para identificação dos micro-organismos isolados, foram utilizados *primers* de amplificação das regiões 16S do rRNA ribossomal e ITS (Internal Transcribed Spacer) de leveduras, sendo feita uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos fragmentos. As condições utilizadas para a multiplicação da região 16S foi: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, 35 ciclos (94°C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 2 min) e 10 min de extensão final a 72° C. As condições utilizadas para a multiplicação da região ITS foi: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min (60 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, 94 °C por 1 min, 60 °C por 2 min e 72 °C por 10 min).

A fim de confirmar a correta amplificação das regiões de interesse foi feita uma eletroforese em gel de agarose 0,8% (~1,5 kb para 16S e ~ 0,5 kb para ITS). As bandas do gel correspondentes ao material amplificado na etapa de PCR foram excisadas diretamente em um transluminador UV e o material genético extraído da agarose por aquecimento em agitador com controle de temperatura. Após, os fragmentos de interesse foram purificados com o auxílio do kit de purificação Purelink™ (Invitrogen). Para avaliar a qualidade e concentração das amostras purificadas o equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado.

O sequenciamento foi realizado pela ATCGenes análises moleculares (Centro de Biotecnologia, UFRGS) em um sequenciador AS 3500xl Genetic Analyzer – Applied Biosystems. As sequências de nucleotídeos obtidas foram tratadas e alinhadas para obtenção de *contigs* na ferramenta PHPH disponibilizada pela Embrapa.⁷¹ Os resultados foram comparados com as sequências de nucleotídeos de espécies de referência utilizando a ferramenta NCBI BLAST.⁷²

4.3.5.4 Testes de sensibilidade dos micro-organismos a concentrações crescentes dos analitos

Para a avaliação da tolerância específica frente as concentrações de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr, foi feito um experimento para observar a sensibilidade do micro-organismo de referência e dos micro-organismos isolados frente a concentrações crescentes de cada metal. Para isso, os micro-organismos isolados (A Sb 1 e A Sb 3) e o de referência *B. subtilis* (ATCC 6633) foram cultivados em meio líquido LB (30 °C por 24h a 200 rpm). Após o cultivo, foi feita a centrifugação para a remoção de todo conteúdo nutritivo do meio seguido por duas lavagens com água estéril.

A concentração de células foi então padronizada para densidade óptica (OD) em 600 nm de 0,8 de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm. Esta determinação da turbidez do meio em espectrofotômetro é utilizada para inferir o crescimento celular (método *CellGrowth*). Após, esta concentração de células foi diluída em séries de 10, 100, 1000 e 10000 vezes. Uma alíquota de 3 µL de cada diluição, incluindo a concentrada, foi dispensada em placas de meio sólido LB contendo diferentes concentrações de cada analito, variando de 1 a 10 vezes a concentração do metal.

Após as 24 h de ensaio, foi observado visualmente o crescimento das colônias de micro-organismos que foram tolerantes as concentrações de cada analito. Os ensaios foram feitos em duplicata.

4.3.6 Ensaios de biorremediação em soluções sintéticas

Para avaliar o potencial de aplicação dos micro-organismos na remoção de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr, o Fe foi inicialmente avaliado. Para isso, foi feito um planejamento fatorial 2² com duas variáveis independentes, tempo e quantidade de célula, onde o tempo variou de 1 a 60 min e a quantidade de células, expressa por OD em 600 nm, variou de 0,4 a 1,2 abs. O planejamento incluiu 4 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, totalizando 11 ensaios. As concentrações dos metais usadas para os ensaios de biorremediação foram baseadas nas determinações feitas anteriormente por ICP-OES após a decomposição das amostras de águas de produção por MW-UV. A seguir, na Tabela 3 é mostrada a matriz com delineamento experimental utilizada assim como a matriz obtida para realização dos ensaios.

Tabela 3. Matriz com planejamento fatorial e valores obtidos para fazer os ensaios.

Ensaio	Tempo	Quantidade de células	Tempo (min)	Quantidade de células (OD em 600 nm em abs)
1	-1	-1	9	0,520
2	+1	-1	51	0,520
3	-1	+1	9	1,08
4	+1	+1	51	1,08
5	-1,41	0	1	0,800
6	+1,41	0	60	0,800
7	0	-1,41	30	0,400
8	0	+1,41	30	1,20
9	0	0	30	0,800
10	0	0	30	0,800
11	0	0	30	0,800

Para realização destes ensaios, foi preparada uma amostra sintética onde foi utilizado um meio pobre em nutrientes (0,5% glicose e 0,1% de NH_4NO_3) que continha 40 mg L^{-1} de Fe. Após o preparo do meio contendo Fe, uma alíquota de 18 mL foi adicionada em um frasco de polipropileno (50 mL) juntamente com 2 mL de células na condição de OD em 600 nm otimizada pelo planejamento fatorial. Os frascos contendo a interação célula-metal, bem como os respectivos controles (controle negativo: somente metal e controle positivo: somente célula), foram incubados em agitador orbital a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por até 60 min com agitação de 200 rpm. Após a interação, as células foram separadas por centrifugação a 9000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi armazenado. O material sólido (células com metal internalizado ou fortemente aderido) foi armazenado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

O sobrenadante foi analisado por F AAS para a determinação da concentração de Fe e posterior cálculo de remoção. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e o micro-organismo comercial *B. subtilis* (ATCC 6633) foi utilizado para as interações.

Para Ca e Mg, o planejamento fatorial foi similar, entretanto a concentração de Ca e Mg para as interações foram de 500 mg L^{-1} . Os ensaios foram procedidos de maneira similar, adicionando 18 mL de meio contendo o metal respectivo juntamente com 2 mL de células na condição de OD em 600 nm otimizada pelo planejamento fatorial. Após a interação, as células foram separadas por centrifugação a 9000 rpm por 10 min e o

sobrenadante foi armazenado e posteriormente analisado por F AAS. Todos ensaios foram feitos em triplicata.

Os resultados obtidos foram avaliados utilizando o método de superfície de resposta e, todos os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o software Statistic V.12.5 (Statsoft).

Para as interações do micro-organismo *B. subtilis* com Ba e Sr, foram utilizadas as condições otimizadas nos planejamentos fatoriais feitos para Ca, Fe e Mg. Os ensaios foram feitos adicionando 18 mL de meio contendo o respectivo metal juntamente com 2 mL de células na condição de 1,08 abs de OD em 600 nm e 9 min de tempo de interação e 2,2 abs de OD em 600 nm e 30 min de interação. A concentração de Ba e Sr para estes ensaios de interação foi de 40 e 140 mg L⁻¹, respectivamente. Após a interação, as células foram separadas por centrifugação a 9000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi armazenado e posteriormente analisado por ICP-OES.

4.3.6.1 Ensaios de balanço de massa

Para avaliação da concentração de metal presente nas paredes do micro-organismo foi feita a lavagem do material sólido (células com metal internalizado ou fortemente aderido), armazenado após as interações, com 10 mL de HNO₃ 10%. A solução de lavagem foi agitada por 2 min em agitador vórtex e centrifugada. Foi utilizado um microscópio (modelo Axioskop 40, Zeiss, Alemanha) para visualizar a integridade das paredes celulares do micro-organismo e, o sobrenadante foi separado para ser analisado por F AAS (Ca, Fe e Mg) e por ICP-OES (Ba e Sr).

Após a lavagem, foi adicionado na biomassa armazenada 4 mL de HNO₃ 50% para a decomposição por via úmida em bloco digestor (modelo DK heating digester, Velp Scientifica, Itália) à 130 °C por 30 min. Posterior a decomposição, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno e diluídos a 15 mL com água ultrapura para análise por F AAS e ICP-OES.

Após a interação do micro-organismo com o respectivo metal, a etapa de lavagem e a etapa de decomposição da biomassa, foram feitos os cálculos para o balanço de massa. Foram então calculadas a porcentagem (%) de recuperação para cada metal analisado.

4.3.7 Ensaio de biorremediação nas amostras de águas de produção

Para avaliar o potencial de aplicação do *B. subtilis* na remoção de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr nas quatro amostras de águas de produção selecionadas para a realização deste trabalho, foi aplicada a condição otimizada nos ensaios de biorremediação, feitos nas soluções sintéticas, para cada analito. Para isso, as amostras nomeadas A, B, C e D foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado e diluído 10 vezes. As amostras diluídas foram separadas em várias alíquotas para a fortificação de cada analito. Foram adicionados 40, 500, 40, 500 e 140 mg L⁻¹ para Ba, Ca, Fe, Mg e Sr, respectivamente.

Para proceder com a interação com o micro-organismo *B. subtilis*, uma alíquota de cada amostra fortificada de 18 mL foi adicionada em um frasco de polipropileno (50 mL) juntamente com 2 mL de células na condição de OD em 600 nm otimizada por cada planejamento fatorial, como segue na Tabela 4.

Os frascos contendo a interação célula-amostra, bem como os respectivos controles (controle negativo: somente amostra e controle positivo: somente célula), foram incubados em agitador orbital a 30 °C com agitação de 200 rpm.

Tabela 4. Condições utilizadas nos ensaios de biorremediação nas amostras de águas de produção utilizando *B. subtilis*.

Analito	Amostra	OD em 600 nm, abs	Tempo de interação, min
Ca	A, B, C e D (fortificadas com 500 mg L ⁻¹ de Ca)	2,2	30
Ba	A, B, C e D (fortificadas com 40 mg L ⁻¹ de Ba)	2,2	30
Fe	A, B, C e D (fortificadas com 40 mg L ⁻¹ de Fe)	1,08	9
Mg	A, B, C e D (fortificadas com 500 mg L ⁻¹ de Mg)	1,08	9
Sr	A, B, C e D (fortificadas com 140 mg L ⁻¹ de Sr)	2,2	30

Após a interação, as células foram separadas por centrifugação a 9000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi separado para análise. A biomassa de micro-organismos foi armazenada para posterior lavagem e decomposição, com o objetivo de calcular o balanço de massa para cada metal e para cada amostra de água de produção de petróleo.

Para avaliar o potencial de aplicação dos micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3 na remoção de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr, foram selecionadas para os ensaios as amostras denominadas A e C. Para prosseguir com os ensaios de biorremediação, foram aplicadas as condições otimizadas anteriormente, feitas nas soluções sintéticas para cada analito.

As amostras A e C foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado e diluído 10 vezes. Similiar aos ensaios de biorremediação nas amostras de águas de produção utilizando *B. subtilis*, as amostras diluídas foram separadas em várias alíquotas para a fortificação de cada analito. Foram adicionados 40, 500, 40, 500 e 140 mg L⁻¹ para Ba, Ca, Fe, Mg e Sr, respectivamente.

Para a interação com os micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3, uma alíquota de cada amostra fortificada de 18 mL foi adicionada em um frasco de polipropileno (50 mL) juntamente com 2 mL de células na condição de OD em 600 nm otimizada por cada planejamento fatorial. Os frascos contendo a interação célula-amostra foram incubados em agitador orbital e, após a interação, as células foram separadas por centrifugação e o sobrenadante foi separado para análise.

A biomassa de micro-organismos foi armazenada para posterior lavagem e decomposição, com o objetivo de calcular o balanço de massa para cada metal. Todos ensaios foram feitos em triplicata.

4.3.8 Ensaios de biorremediação em soluções multielementares utilizando *Bacillus subtilis*, A Sb 1 e A Sb 3

Para avaliar o potencial de aplicação dos micro-organismos na remoção de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr em soluções multielementares foram feitas soluções sintéticas e as amostras A e C fortificadas, contendo todos os analitos. Para o preparo da solução sintética foi utilizado um meio pobre em nutrientes (0,5% glicose e 0,1% de NH₄NO₃) que continha 40, 500, 40, 500 e 140 mg L⁻¹ de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr. Para o preparo da amostra fortificada, as amostras nomeadas A e C foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado e diluído 10 vezes. As amostras diluídas foram separadas em alíquotas para a fortificação de todos os analito na mesma condição de concentração na solução sintética.

Os ensaios de biorremediação foram feitos aplicando as condições otimizadas nos planejamentos e foram utilizados *B. subtilis*, A Sb 1 e A Sb 3 para a remoção dos analitos. Após as interações, o sobrenadante foi separado para análise, a biomassa centrifugada foi lavada e após foi decomposta para os cálculos de balanço de massa. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Na Figura 5 é mostrado um fluxograma que sintetiza as três linhas principais que o trabalho foi separado, bem como todas as etapas que foram avaliadas.

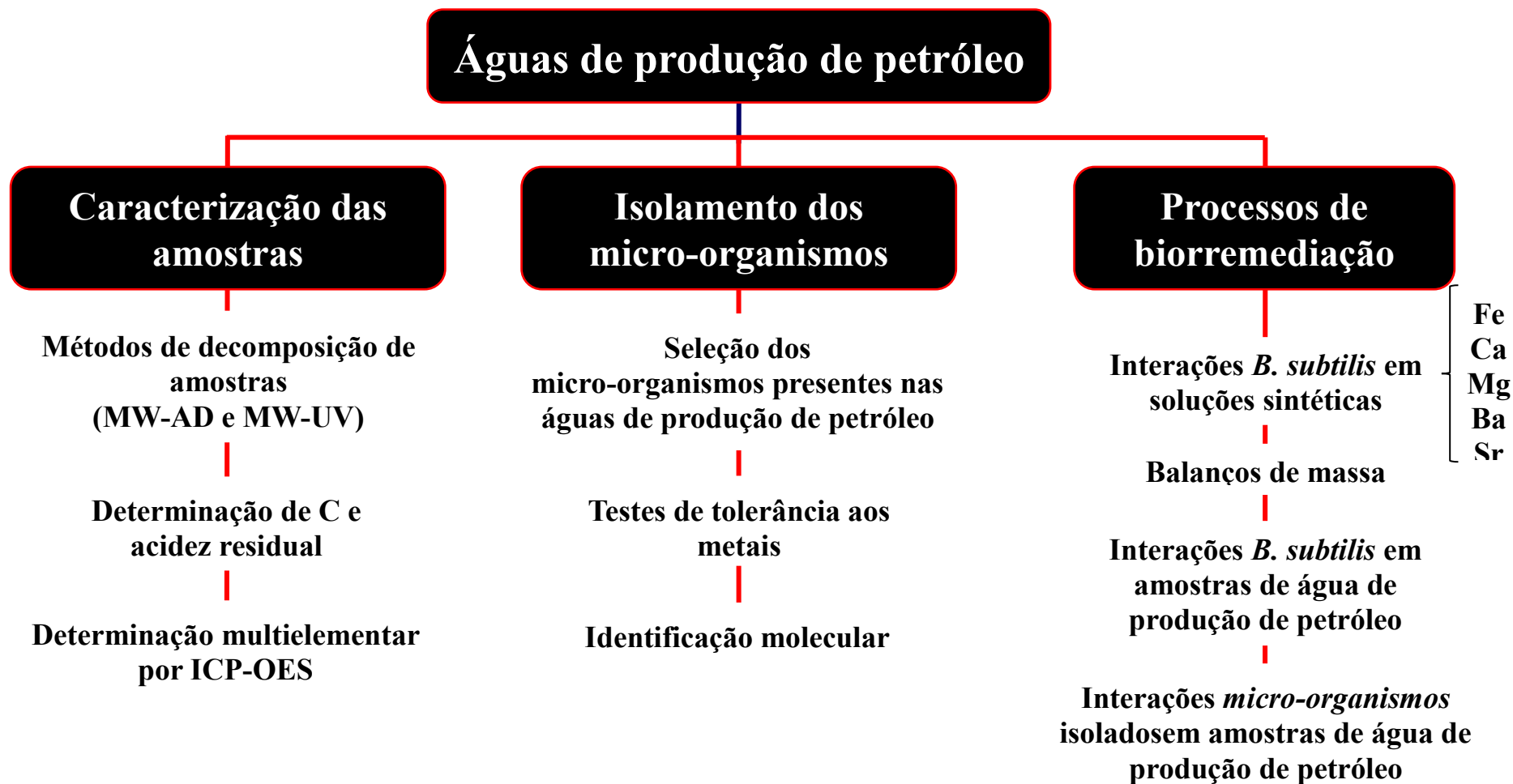


Figura 5. Fluxograma das três linhas principais do trabalho que visa o tratamento de águas de produção de petróleo, bem como todas as etapas avaliadas.

5 RESULTADOS

PARTE 1

A apresentação e discussão dos resultados foi dividida em duas partes principais, de acordo com os objetivos do presente trabalho. Na primeira parte, são apresentados os resultados do desenvolvimento do método de preparo de amostra por MW-UV para decomposição das águas de produção provenientes da extração de petróleo visando a posterior determinação de metais.

Na segunda parte dos resultados, são apresentados os resultados envolvendo o uso de micro-organismos para a remoção de metais, onde foram feitos o isolamento e a seleção dos micro-organismos presentes naturalmente nas amostras, caracterização dos mesmos e após, foram feitos os estudos de biorremediação.

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS POR MW-UV PARA DECOMPOSIÇÃO DE ÁGUAS DE PRODUÇÃO PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE METAIS

5.1.1. Caracterização das amostras

Quatro amostras de águas de produção obtidas a partir da extração de petróleo, nomeadas por A, B, C e D (Figura 6) foram utilizadas neste trabalho. Algumas características das amostras foram, previamente, determinadas as quais estão mostradas na Tabela 5.

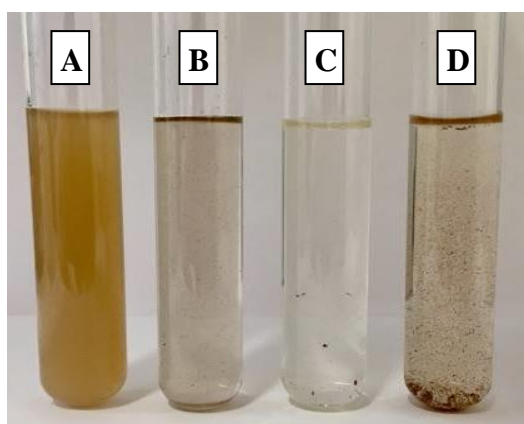


Figura 6. Amostras de águas de produção de petróleo obtidas a partir da extração de petróleo, nomeadas por A, B, C e D.

Tabela 5. Características das águas de produção obtidas a partir da extração do petróleo utilizadas neste trabalho.

Parâmetro	Água de produção de petróleo			
	A	B	C	D
pH	6 - 7	6 - 7	6 - 7	6 - 7
Cor, mg L ⁻¹ Pt/Co	> 70	> 70	> 70	> 70
NaCl, %	2,17 ± 0,27	1,31 ± 0,04	5,33 ± 0,19	2,36 ± 0,45
TOC, mg L ⁻¹	155 ± 3	41,6 ± 1,7	12,0 ± 2,2	29,7 ± 1,0
Sólidos totais, g L ⁻¹	0,29 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,43 ± 0,02
Turbidez, NTU	196	19	18	77

Como é possível observar através da Tabela 5 as amostras de águas de produção estudadas neste trabalho possuem características bem variadas, onde a amostra A apresenta um alto teor de TOC em relação as demais amostras de águas de produção e a amostra D possui um alto teor de sólidos totais. Em geral, a concentração de Cl^- nestas amostras foi de aproximadamente 2%, exceto para a amostra D que foi de 5%. Os valores de pH ficaram na faixa de 6 -7 e os valores de cor foram superiores a $70 \text{ mg L}^{-1} \text{ Pt/Co}$ para todas as amostras. Valores mais baixos de turbidez foram encontrados para as amostras B e C, na faixa de 20 NTU, enquanto valores mais altos foram encontrados para as amostras A e D, 196 e 77 NTU, respectivamente.

Cabe destacar que os valores de TOC obtidos para todas as amostras foram subestimados devido à presença de sólidos suspensos. Para realizar a medida de TOC no equipamento, uma alíquota foi retirada do sobrenadante a fim de não intupir a seringa do *autosampler* e conseqüentemente, danificar o equipamento.

Após a caracterização das amostras, foi feito o estudo dos métodos de preparo de amostras visando o tratamento das águas de produção para posterior caracterização quanto à concentração de metais. Esta etapa é necessária tendo em vista que a caracterização das amostras é uma etapa complexa e, para poder desenvolver métodos adequados para a remoção de metais é preciso, inicialmente, ter conhecimento da constituição química das amostras. Para isso, os métodos de MW-UV e MW-AD foram investigados.

5.1.2 Decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV)

Embora as águas de produção apresentem diversas características diferentes, apenas uma amostra foi escolhida para a otimização do método proposto tendo em vista o volume de amostra disponível para execução de todo o trabalho. Inicialmente, para a otimização do método por MW-UV, foi escolhida a amostra B, que foi a amostra selecionada devido ao maior volume disponível para os experimentos.

Primeiramente, foi feita a avaliação do programa de aquecimento onde uma massa de 8 g de amostra, juntamente com 4 mL de HNO_3 e 2 mL H_2O_2 foi submetida a decomposição. O volume total de reagentes foi fixado em 14 mL com o objetivo de cobrir toda a superfície da lâmpada de UV e assim, proporcionar um maior aproveitamento da emissão de radiação UV no meio reacional. O programa de aquecimento inicialmente usado foi de: i) 15 min até 850 W, ii) 15 min a 850 W e iii) 20 min a 0 W, que é o programa de aquecimento recomendado pelo fabricante do

equipamento para amostras de águas residuais. Quando este programa foi aplicado, verificou-se que a energia da radiação micro-ondas foi interrompida durante o tempo de aquecimento devido ao aumento de pressão (o forno de micro-ondas controla a taxa de pressão e, dependendo do valor estabelecido, a radiação micro-ondas é interrompida para evitar um aumento excessivo de pressão). Neste caso, a taxa de pressão selecionada foi de $0,5 \text{ bar s}^{-1}$ e, a radiação micro-ondas aplicada foi cerca de 700 W. Portanto, esse valor (700 W) foi selecionado para os próximos experimentos.

Uma importante consideração é que a intensidade de radiação UV durante o procedimento de decomposição depende da energia da radiação micro-ondas. Portanto, é importante selecionar uma potência de radiação micro-ondas que seja efetivamente aplicada durante o programa de aquecimento para evitar interrupções da irradiação micro-ondas que, conseqüentemente, interrompe o funcionamento das lâmpadas UV. Foi observado, também, que a rampa utilizada (15 min) era muito longa, e uma vez que a pressão máxima e as temperaturas alcançadas foram inferiores aos valores máximos estabelecidos, a rampa foi reduzida para 5 min. É importante mencionar que mesmo usando 5 min de rampa, a pressão e a temperatura máximas foram controladas e os experimentos foram considerados seguros. A redução do tempo de aquecimento é um fator importante na obtenção de uma alta frequência analítica.

Foram também avaliados valores mais baixos de potência de micro-ondas que poderiam ser eficientes para o tratamento das águas de produção. As seguintes potências de micro-ondas foram avaliadas: 200, 350 e 500 W. Para estes estudos, a massa da amostra e os volumes dos reagentes foram mantidos iguais (8 g de amostra, 4 mL de HNO_3 e 2 mL de H_2O_2), e a rampa e o tempo de aquecimento foram ajustados em 5 e 30 min, respectivamente. Após o final do programa, a concentração do TOC foi determinada nos digeridos e, observou-se que valores mais baixos foram obtidos quando foram utilizados 700 W. Este fato é esperado, uma vez que a temperatura alcançada foi maior quando 700 W foram usados e este parâmetro está diretamente relacionado à eficiência de decomposição.

Para obter melhores condições de decomposição, diferentes concentrações de HNO_3 combinadas com o uso de H_2O_2 (0 a 4 mol L^{-1} de HNO_3 e 0 a 2 mL de H_2O_2) também foram avaliadas com o objetivo de utilizar reagentes diluídos na etapa de preparo das amostras. A concentração de HNO_3 e o volume de H_2O_2 foram avaliados nas seguintes condições: 0, 0,8, 3,5 e 4 mol L^{-1} de HNO_3 e 0, 0,4, 1,5 e 2 mL de H_2O_2 , onde o volume de solução final foi sempre mantido em 14 mL (em alguns casos, o

volume final foi preenchido com água ultrapura). Esses experimentos foram realizados usando 5 min de rampa e 30 min de aquecimento a 700 W. Foi observado que quando a concentração de HNO₃ foi fixada e a concentração de H₂O₂ foi aumentada, os valores de TOC encontrados nas soluções finais foram inferiores, como já era esperado. Esse fato está associado à formação de espécies reativas pela ação das lâmpadas UV que podem acelerar a decomposição da matéria orgânica. Embora observada uma baixa redução na concentração de TOC quando volumes maiores que 0,4 mL de H₂O₂ foram usados, não houve uma diferença significativa (test *t*, nível de confiança de 95%) nas concentrações obtidas nas soluções finais e, devido a isso, foi escolhido 0,4 mL de H₂O₂ para os próximos estudos.

Como observado na avaliação do volume de H₂O₂, quando a concentração de HNO₃ variou de 0,8 a 4 mol L⁻¹, os valores obtidos de TOC nas soluções finais não apresentaram diferença significativa (test *t*, nível de confiança de 95%), e 0,8 mol L⁻¹ de HNO₃ foi escolhido para os estudos posteriores. Considerando as condições otimizadas (8 g de amostra, 0,8 mol L⁻¹ de HNO₃ e 0,4 mL de H₂O₂), cerca de 4,8 mL de água ultrapura foram adicionados aos fracos de quartzo para manter o volume final em 14 mL. Neste caso, a concentração final de HNO₃ em solução foi de 0,8 mol L⁻¹ e concentrações inferiores a 8,5 mg de L⁻¹ de TOC (RCC cerca de 20,4%) foram encontrados para a decomposição da água de produção B por MW-UV.

Além da otimização da potência de micro-ondas e das concentrações de HNO₃ e H₂O₂, o tempo de aquecimento também foi avaliado. Primeiramente, a decomposição foi feita utilizando um programa de aquecimento de 30 min (sendo 5 min de rampa), e as soluções finais foram claras e sem resíduos aparentes. Para reduzir o tempo de aquecimento, 15 e 20 min foram avaliados e, observou-se que os digeridos foram claros e sem resíduos. Após a determinação da concentração de carbono orgânico total, foi observado que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos usando tempos de aquecimento de 15 min e 20 min (teste *t-student*, nível de confiança de 95%). Quando foi utilizado um tempo de aquecimento de 10 min, observou-se que a amostra não foi completamente decomposta (as soluções finais não foram claras e foram observados resíduos sólidos em solução). Assim, o tempo de aquecimento otimizado foi de 15 min (sendo 5 min de rampa), e ao usar esta condição, a concentração de carbono orgânico total foi menor que 9 mg L⁻¹ (RCC inferior a 21,6%).

Após a otimização do método proposto, condições adequadas de decomposição de águas de produção foram alcançadas utilizando 8 g de amostra, 0,8 mol L⁻¹ de HNO₃, 0,4 mL de H₂O₂, potência de micro-ondas de 700 W e um tempo de aquecimento de 15 min (rampa de 5 min). Essas condições otimizadas apresentaram eficiência de decomposição adequada quando aplicadas a quatro amostras de águas de produção com características variáveis. Após a decomposição das amostras, a redução do carbono orgânico total foi de 98, 80, 78 e 48% para as amostras A, B, C e D, respectivamente. Estes valores foram calculados considerando o TOC presente nas amostras originais e os valores obtidos após a decomposição por MW-UV. É importante mencionar que a redução do TOC foi menor para a amostra “D” (cerca de 48%) em comparação com as outras amostras investigadas. A amostra “D” apresentou a maior concentração de sólidos totais e, neste caso, para a medida do TOC na amostra original (sem tratamento), a alíquota utilizada foi retirada do sobrenadante para evitar o bloqueio da seringa do *autosampler* e, conseqüentemente, danos ao equipamento. Este procedimento também foi feito para as medidas de TOC em todas as amostras. Nesse caso, os valores de TOC em amostras sem o tratamento pode estar subestimado devido à presença de sólidos. Este fato pode ser comprovado pelo alto teor de matéria orgânica (estimado usando a demanda química de oxigênio (DQO)) nas amostras investigadas, que é superior a 1500 mg de O₂ L⁻¹.

Além disso, a acidez residual foi determinada nos digeridos finais obtidos por MW-UV por titulação. Observou-se que a acidez residual nas soluções finais para todas as amostras foi menor que 0,41 mol L⁻¹. Portanto, com base nos resultados obtidos e levando em consideração a redução dos valores de TOC e a baixa acidez residual, o método proposto é adequado para o tratamento de águas de produção para a posterior determinação de metais.

5.1.3 Decomposição assistida por radiação micro-ondas (MW-AD)

Com o objetivo de comparar a eficiência de decomposição do método de MW-UV, a decomposição da água de produção B também foi feita por MW-AD utilizando as condições otimizadas no método de MW-UV (programa de aquecimento, volume e concentração dos reagentes), sem a presença das lâmpadas de UV. Na Figura 7, é possível observar os diferentes aspectos entre a água de produção original, o aspecto da amostra após a MW-AD e após a MW-UV. As soluções finais obtidas por

MW-UV foram claras e sem resíduos enquanto que as soluções finais por MW-AD foram ligeiramente amarelas e com resíduos sólidos.

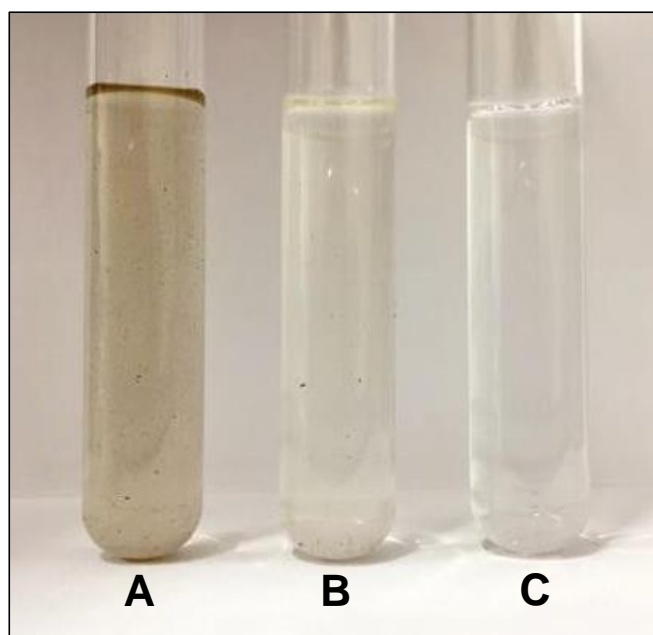


Figura 7. Aspecto da amostra original de água de produção de petróleo B (A), solução final obtida após a MW-AD (B) e após a MW-UV (C).

Com relação ao tempo para decomposição e a frequência analítica, as condições obtidas para os métodos MW-AD e MW-UV foram semelhantes, já que o tempo de aquecimento por radiação micro-ondas foi o mesmo e oito amostras foram decompostas em 45 min (incluindo o tempo de manipulação, decomposição e resfriamento). Apesar de ambos os métodos MW-AD e MW-UV permitirem a decomposição de águas de produção, apenas usando o método proposto de MW-UV foi possível decompor totalmente todas as amostras e soluções finais com baixos valores de RCC foram obtidas. Usando MW-AD, algumas amostras (por exemplo, amostras B e D) não foram completamente decompostas e foram observados resíduos sólidos e óleo nas soluções finais o que impossibilitou a introdução dessas soluções para posterior análise. Além disso, a MW-UV foi eficiente para decompor as amostras de águas de produção com características diferentes usando as mesmas condições operacionais.

O método proposto utiliza $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 e H_2O_2 para tratar amostras reais de águas de produção, possibilitando o uso de soluções diluídas, evitando o consumo excessivo de reagentes e minimizando a geração de resíduos. Conseqüentemente,

melhores LOQs foram obtidos para todos os analitos. Portanto, as soluções finais obtidas por MW-UV foram adequadas para a posterior determinação de metais por ICP-OES.

Cabe destacar que esta é a primeira aplicação que realiza a decomposição de águas de produção obtidas a partir da extração do petróleo por MW-UV usando soluções diluídas. O método proposto permitiu minimizar várias desvantagens relatadas na literatura em relação à etapa de preparo de amostras, como: a geração de grandes volumes de resíduos, o uso de reagentes tóxicos, altos valores de brancos e LOQs inadequadas para a determinação dos analitos. É importante mencionar que, quando o mesmo programa de aquecimento e a mesma concentração de reagentes foram usados para a decomposição das amostras por MW-AD (sem a inserção de lâmpadas UV dentro dos frascos de quartzo), a decomposição não foi eficiente, pois foram observados resíduos sólidos nas soluções finais de algumas amostras.

Portanto, o método MW-UV pode ser considerado uma alternativa promissora para tratar as amostras de águas de produção para posterior determinação de metais. É importante mencionar que esse método fornece uma eficiência para a redução nos valores de TOC pelo menos duas vezes maior que a de o método convencional MW-AD, mesmo usando uma solução diluída composta por 0,8 mol L⁻¹ de HNO₃ e 0,4 mL de H₂O₂ para a decomposição de 8 g de água de produção. O H₂O₂ é um reagente adicional utilizado com elevada frequência devido à geração dos radicais OH[•] que possuem alto poder oxidante que promovem uma eficiente oxidação e degradação das espécies orgânicas.²⁰ Além disso, o conteúdo de sólidos totais foi reduzido para valores inferiores a 0,02 g L⁻¹. Alguns trabalhos publicados na literatura observaram uma eficiente decomposição com a utilização do método de MW-UV e a consequente redução nos valores de TOC para diversos tipos de matriz como leite em pó, petróleo, coque de petróleo, margarina, chocolate, biodiesel, algas marinhas e águas naturais.^{14-18,21,22}

5.1.4 Determinação de metais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

Para minimizar interferências não espectrais na etapa de determinação de metais por ICP-OES, como a alta salinidade, Y e Sc foram avaliados como IS. Penha *et al.*⁴⁸ também avaliaram a utilização de IS para a determinação de metais em amostras de águas de produção. Os autores concluíram que para Ni não havia a necessidade de uso

do IS, enquanto que para Co, Cr, Fe, Mn e V foi necessária a utilização de Sc como IS. Além disso, eles concluíram que para Se foi necessário o uso de Y como IS. A utilização de mais de um IS acaba sendo uma desvantagem para as análises pois faz-se necessário o uso de condições variáveis para a determinação dos analitos.⁴⁸

Para a avaliação do uso de Sc e Y como IS, foi feita adição dos analitos a partir de uma solução de referência nos digeridos da amostra B obtidas após a decomposição por MW-UV. Na Tabela 6 são mostradas as recuperações obtidas sem o uso do IS, com Y e com Sc.

Tabela 6. Recuperações (%) obtidas após a avaliação do uso de padrão interno para a determinação de Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, V e Zn por ICP-OES (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Amostra B		
	Sem o uso do IS	Y como IS	Sc como IS
Cd	69 \pm 1	81 \pm 1	96 \pm 3
Co	75 \pm 1	89 \pm 1	92 \pm 2
Cr	85 \pm 2	102 \pm 4	94 \pm 4
Cu	94 \pm 1	109 \pm 4	104 \pm 4
Fe	102 \pm 3	114 \pm 6	108 \pm 5
Mn	90 \pm 3	100 \pm 2	94 \pm 1
Ni	69 \pm 1	84 \pm 2	90 \pm 1
V	93 \pm 2	108 \pm 1	103 \pm 2

Ba, Ca, K, Mg, Na, Pb, Sr e Zn: recuperações superiores a 90% sem o uso do IS, com o uso de Y ou Sc como IS

Para Ba, Ca, K, Mg, Na, Pb, Sr e Zn foram obtidas recuperações superiores a 90% sem o uso do IS, com o uso de Y ou Sc como IS. Foi observado que as recuperações obtidas sem IS foram na faixa de 69 a 102% e valores inferiores (na faixa de 69 a 85%) foram observados para Cd, Co, Cr e Ni. Para os demais elementos, foram obtidas recuperações superiores a 90% sem o uso de IS. Quando Y ou Sc foram utilizados como IS, recuperações superiores a 80% foram observadas para todos os analitos. Os valores com ambos os padrões internos resultaram em recuperações maiores ou similares quando

comparados aos obtidos sem IS, principalmente para Cd e Ni (69% de recuperação para ambos os analitos sem IS), onde recuperações maiores de 81% foram obtidas com IS.

Escândio foi escolhido como IS para a determinação multielementar por ICP-OES devido aos melhores valores de recuperação obtidos para a maioria dos elementos quando comparados com os valores obtidos com Y como IS. Apesar do uso do IS ter apresentado resultados similares quando este não foi utilizado para a determinação de alguns elementos, condições finais usando Sc foram selecionadas para estabelecer um procedimento que permitisse a determinação de todos os analitos com boas recuperações.

Após a decomposição das amostras de águas de produção por MW-UV usando as condições otimizadas, foi feita a determinação de Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, V e Zn por ICP-OES. Os resultados obtidos para as amostras A, B, C e D pelo método proposto são mostrados na Tabela 7, bem como os LOQs para todos os analitos.

Tabela 7. Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, obtidos para todos os analitos por ICP-OES em amostras de água de produção da extração de petróleo após MW-UV. As determinações foram feitas utilizando Sc como padrão interno (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Amostra				LOQ
	A	B	C	D	
Ba	9,00 \pm 0,43	5,59 \pm 0,12	1,72 \pm 0,12	38,3 \pm 0,9	0,006
Ca	3551 \pm 163	445 \pm 3	2315 \pm 83	1957 \pm 81	0,462
Cd	<0,004*	<0,004*	<0,004*	<0,004*	0,004
Co	<0,004*	<0,004*	<0,004*	<0,004*	0,004
Cr	<0,005*	<0,005*	<0,005*	<0,005*	0,005
Cu	<0,037*	<0,037*	<0,037*	<0,037*	0,037
Fe	1,06 \pm 0,03	1,00 \pm 0,12	1,29 \pm 0,02	41,2 \pm 1,0	0,021
K	192 \pm 8	89,0 \pm 2,1	440 \pm 20	847 \pm 65	0,013
Mg	623 \pm 13	127 \pm 6	1046 \pm 47	572 \pm 55	0,034
Mn	1,19 \pm 0,02	0,250 \pm 0,010	0,440 \pm 0,020	1,73 \pm 0,01	0,003
Na	16849 \pm 518	4358 \pm 110	38608 \pm 979	14678 \pm 476	0,103
Ni	<0,040*	<0,040*	<0,040*	<0,040*	0,040
Pb	<0,021*	<0,021*	<0,021*	<0,021*	0,021
Sr	120 \pm 5	24,7 \pm 0,9	69,8 \pm 2,4	138 \pm 2	0,004
V	<0,091*	<0,091*	<0,091*	<0,091*	0,091
Zn	<0,058*	0,112 \pm 0,038	<0,058*	1,10 \pm 0,05	0,058

*Resultados abaixo dos limites de quantificação (10σ).

Como pode ser observado na Tabela 7, a concentração dos analitos nas amostras de água de produção de petróleo são bem variadas. Provavelmente isso está relacionado às diferentes origens dessas amostras, pois essa variação pode ser resultado da idade e da geologia das formações a partir das quais o petróleo e o gás são produzidos. Além disso, alguns metais podem estar presentes nas águas de produção de petróleo em concentrações mais elevadas quando comparadas as concentrações nas águas do mar. Dentre os metais encontrados em maiores concentrações nas amostras de águas de produção estão o Ba, Fe, Mn e Zn. Cabe salientar que as concentrações encontradas nas

amostras estudadas neste trabalho foram condizentes com as demais descritas na literatura, onde para Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, V e Zn foram encontradas concentrações na faixa de 301 a 342000, 0,02 a 10, 0,1 a 34, 0,2 a 137, 1910 a 37000, 0,09 a 45, 81 a 7000, 0,1 a 420, 0,1 a 1,2 e 1 a 26000 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.³

Pode ser observado nas amostras de águas de produção de petróleo estudadas neste trabalho que alguns analitos, como Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb e V, estavam abaixo do LOQ para todas as amostras. Os limites de quantificação foram calculados com base na recomendação da IUPAC⁷³, usando a fórmula $10s + x_b$, para $n = 10$, onde s é o desvio padrão obtido para 10 leituras do branco e x_b é a média da concentração do analito nos brancos. Para as amostras A e C, Zn também estava abaixo do LOQ e, para as amostras B e D, as concentrações de Zn foram de $0,112 \pm 0,038$ e $1,10 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A concentração de Na para todas as amostras estava na faixa de 4358 a 38608 $\mu\text{g g}^{-1}$, o que era esperado devido à alta salinidade dessas amostras.

Cabe destacar que Ba, Ca, Fe, Mg e Sr estavam presentes nas amostras de água de produção de petróleo. A presença de Ba, Ca e Sr deve ser controlada devido à possível formação de sulfatos pouco solúveis que podem precipitar nas linhas de produção. De acordo com a literatura, Fe e Mn poderiam também precipitar como hidróxidos quando a água é exposta a atmosfera e, por isso, também devem ser controlados.³ Como esperado, as concentrações encontradas de Pb e Zn foram baixas, porque a presença desses metais está associado às estruturas de aço galvanizado do equipamento que entra em contato com a amostra.³

Cabe destacar que a determinação de metais em amostras de águas de produção é importante para se tomar uma decisão adequada sobre o tratamento desse efluente para descarte final ou reutilização, pois alguns metais que poderiam causar problemas para a indústria petroquímica estavam presentes nas amostras analisadas. Além da presença de concentrações relevantes de metais o que demonstra a dimensão da poluição gerada pelo descarte incorreto do efluente. Considerando o fato de que os organismos marinhos estão habituados às baixas concentrações de metais nas águas do mar, a alteração destes níveis, pelo descarte das águas de produção ao ambiente, pode acarretar danos severos à biodiversidade. Além disso, a determinação de metais nas amostras de águas de produção de petróleo é relevante para que sejam atendidas as concentrações máximas permitidas pelo órgão responsável para o descarte de metais nos corpos de água.^{5,6}

5.1.5 Avaliação da exatidão do método proposto

Para avaliar a exatidão do método proposto, um CRM (*SCP Science EP-H-3 drinking water*) foi decomposto usando a MW-UV e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados, em mg L⁻¹, obtidos após a decomposição do CRM (*SCP Science EP-H-3 drinking water*) por MW-UV. As determinações dos elementos por ICP-OES foram feitas utilizando Sc como padrão interno (média ± desvio padrão, n = 3).

Analito	Valor encontrado	Valor certificado	Concordância (%)
Ba	68,6 ± 6,5	77,7 ± 1,8	88,3
Ca	955 ± 81	1018 ± 17	93,8
Cd	5,04 ± 0,10	4,90 ± 0,10	103
Co	3,61 ± 0,11	3,66 ± 0,07	98,6
Cr	24,2 ± 0,9	24,2 ± 0,5	100
Cu	49,8 ± 2,7	48,7 ± 1,3	102
Fe	49,9 ± 3,3	46,9 ± 0,5	106
K	641 ± 38	593 ± 9	108
Mg	338 ± 24	331 ± 7	102
Mn	10,4 ± 0,5	10,9 ± 0,3	95,4
Na	747 ± 56	764 ± 22	97,8
Ni	26,5 ± 1,9	24,2 ± 0,5	109
Pb	18,9 ± 1,0	19,3 ± 0,5	97,9
Sr	37,3 ± 0,6	36,3 ± 0,7	103
V	38,9 ± 1,5	37,6 ± 0,6	103
Zn	246 ± 3	242 ± 4	102

Não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos pelo método proposto e os valores certificados (test *t*, nível de confiança de 95%). A concordância dos resultados foi superior a 94% para a maioria dos analitos (excepto para Ba, onde foi obtida concordância de 88%). Além disso, a decomposição das amostras com fortificação foi feita pela adição de solução de referência contendo todos os analitos.

Após a decomposição, os analitos foram determinados por ICP-OES e as recuperações foram superiores a 90% para todos os elementos químicos estudados.

PARTE 2

5.2 ESTUDO COM OS MICRO-ORGANISMOS

5.2.1 Isolamento dos micro-organismos naturalmente presentes nas águas de produção de petróleo

Com a finalidade de identificar micro-organismos provenientes das águas de produção e, portanto, adaptados ao meio, testes de inoculação da amostra em meio de cultivo próprio para crescimento geral foram feitos. Estes ensaios tiveram como objetivo o isolamento de micro-organismos presentes nas amostras para que estes fossem usados nos processos de biorremediação. Estes micro-organismos poderiam levar à obtenção de melhores resultados para remoção dos metais uma vez que estavam adaptados as condições de pouca disponibilidade de nutrientes presentes nas amostras.

Como parâmetros para o isolamento dos micro-organismos foram utilizadas as diferenças morfológicas das colônias, como regularidade das bordas, ausência ou presença de cor/pigmentação, brilho ou opacidade e relevo. Fungos filamentosos não foram considerados no isolamento, somente bactérias e leveduras.

Desta forma, foram identificadas 26 colônias morfológicamente diferentes, como podem ser observadas na Tabela 9.

Tabela 9. Micro-organismos isolados a partir das amostras de águas de produção.

Amostra	Meio de cultura	
	Luria-Bertani	Sabouraud
A	-	A Sb 1
	-	A Sb 3
B	B LB 1	B Sb 1
	B LB 2	B Sb 2
	B LB 3	B Sb 3
	B LB 4	B Sb 4
	B LB 5	-
	B LB 6	-
	B LB 7	-
C	C LB 1	-
	C LB 2	-
	C LB 3	-
	C LB 4	-
	C LB 5	-
D	D LB 1	D Sb 1
	D LB 2	-
	D LB 3	-
	D LB 4	-
	D LB 5	-
	D LB 6	-
	D LB 7	-

A nomenclatura respectiva para cada micro-organismo isolado está relacionada à amostra de água de origem (A, B, C e D), meio de cultivo de crescimento (LB = Luria Bertani; Sb = Sabouraud) e ordem de isolamento.

Como pode ser observado na Tabela 9, a quantidade de micro-organismos isolados foi mais significativa nas amostras B, C e D, os quais foram isolados entre 5 e 7 micro-organismos em meio LB em cada amostra. Destaca-se que na amostra A (maior teor de óleos e graxas comparada com as demais amostras estudadas) em meio LB não foram isolados nenhum micro-organismo, entretanto, utilizando o meio Sb foram isolados dois micro-organismos (A Sb 1 e A Sb 3). O micro-organismo A Sb 2 não foi

considerado pois não foi possível a diferenciação morfológica deste em função da regularidade das bordas, ausência ou presença de cor/pigmentação, brilho ou opacidade e relevo. Na amostra B, em meio Sb, foi possível isolar 4 micro-organismos diferentes, enquanto que na amostra C nenhum e na amostra D apenas um. A presença de diferentes micro-organismos nas amostras de água de produção de petróleo se deve ao fato da diversidade na composição química destas amostras, uma vez que os constituintes químicos desse efluente variam em função do poço (idade e profundidade) e da formação geológica.

5.2.2 Seleção dos micro-organismos isolados por tolerância às concentrações de metais em meio nutritivo

Com a finalidade de identificar quais micro-organismos eram tolerantes à concentração dos metais (Ba, Ca, Fe e Sr), os 26 micro-organismos isolados foram submetidos a testes de crescimento na presença de concentrações de Ba, Ca, Fe e Sr. Para isso, estes foram incubados por 4 dias em meios contendo os metais separadamente.

As colônias que apresentaram maior facilidade no desenvolvimento, ou seja, crescimentos rápidos, foram consideradas promissoras. As linhagens que se desenvolveram com crescimento tardio foram desconsideradas.

Com base na Tabela 9, dos 26 micro-organismos isolados das águas de produção, apenas 14 micro-organismos foram tolerantes as concentrações dos metais. Os micro-organismos isolados na primeira etapa na amostra A, A Sb 1 e A Sb 3, foram tolerantes e cresceram adequadamente nas placas de crescimento bacteriano contendo os metais. Nas demais amostras, geralmente apenas a metade dos micro-organismos que foram isolados em meio LB foram tolerantes a concentração de metais, este fato pode estar relacionado ao efeito tóxico que elevadas concentrações desses metais podem causar nos micro-organismos.⁵⁹

Os 14 micro-organismos a seguir foram tolerantes: A Sb 1, A Sb 3, B LB 2, B LB 5, B LB 6, B Sb1, C LB 2, C LB 3, C LB 4, D LB 3, D LB 6, D LB 7, D LB 8 e D Sb 1. Cabe destacar que as colônias isoladas nesta etapa foram semelhantes nas suas características às isoladas anteriormente.

5.2.2.1 Seleção dos micro-organismos isolados por tolerância às concentrações de metais em meio mínimo

Para a seleção dos micro-organismos capazes de se desenvolver em meios com baixa disponibilidade de carbono, os micro-organismos resistentes as etapas anteriores, foram semeados em meios de baixa disponibilidade energética suplementados de metais, similar a matriz das águas de produção. Neste experimento, foram considerados todos os micro-organismos que apresentaram desenvolvimento de colônia, mesmo que tardio no meio pobre contendo 0,5% de glicose, 0,1% NH₄OH e metais. Os isolados que apresentaram desenvolvimento nesta etapa de seleção foram o A Sb 1, A Sb 3 e B Sb 1, que estão mostrados na Figura 8. Desses, dois isolados são bactérias (A Sb 1 e A Sb 3) e um é uma levedura (B Sb 1). Esses isolados demonstraram estar adaptados as condições similares às amostras de água de produção de petróleo, como baixa disponibilidade de nutrientes e altas concentrações de metais. Desta forma, somente as bactérias foram selecionadas para testes posteriores, enquanto que a levedura não foi utilizada nos estudos de biorremediação neste trabalho.

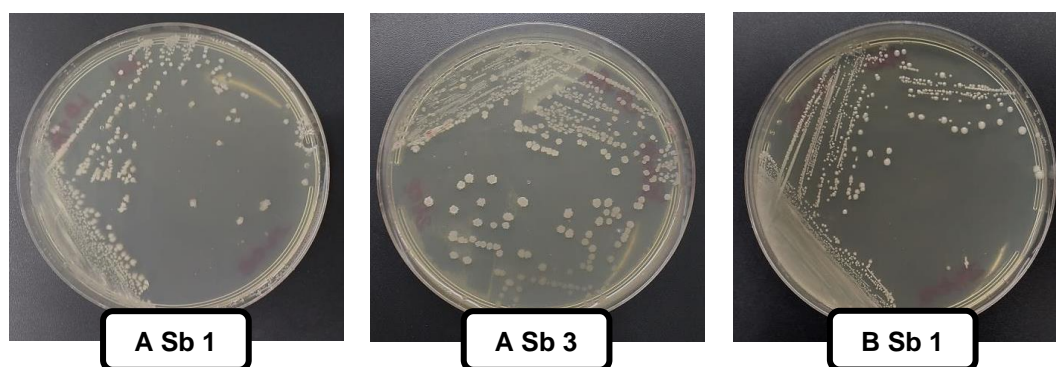


Figura 8. Micro-organismos isolados das amostras de águas de produção adaptados às condições de baixa disponibilidade de nutrientes e altas concentrações de metais.

5.2.3 Identificação morfológica e molecular dos isolados

Após os testes de seleção previamente descritos, os micro-organismos (A Sb 1, A Sb 3 e B Sb 1) foram avaliados através da coloração Gram e identificados por métodos moleculares de sequenciamento de DNA (Tabela 10). Para as identificações moleculares, foram analisadas as sequências parciais dos genes 16S e ITS (para o isolado B Sb 1).

Tabela 10. Identificação morfológica e molecular dos micro-organismos isolados.

Micro-organismo isolado	Morfologia celular	Identificação
A Sb 1	Bacilo Gram-positivo	<i>Bacillus</i> sp.
A Sb 3	Bacilo Gram-positivo	<i>Bacillus</i> sp.
B Sb 1	Leveduriforme	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

O micro-organismo B Sb 1 (*Rhodotorula mucilaginosa*) apresentou a capacidade de se desenvolver mesmo em meios com elevadas concentrações de metais. Isto deve-se provavelmente aos mecanismos de efluxo de metais na levedura. Assim como existem bombas e canais de incorporação de metais, existe o mecanismo oposto para regulação da homeostase e do balanço osmótico intra/extracelular. A levedura B Sb 1, neste caso, provavelmente mantém a concentração dos metais balanceada, de forma que permita a sobrevivência da célula no meio. Apesar desta vantagem, no presente trabalho foi feita a utilização dos micro-organismos do gênero *Bacillus* para a remoção dos metais, uma vez que as condições de remoção para células bacterianas e leveduras são distintas.^{74,75}

Para a inferência filogenética dos isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, foi construído um conjunto de dados utilizando as sequências de 16S obtidas neste trabalho combinadas com sequências previamente utilizadas na identificação de isolados do gênero.^{76,77} O conjunto de sequências foi alinhado utilizando a plataforma GUIDANCE, sendo que a árvore filogenética foi inferida pelo programa PhyML 3.2. A árvore filogenética foi visualizada utilizando o programa FigTree v1.4.4 e é mostrada na Figura 9.

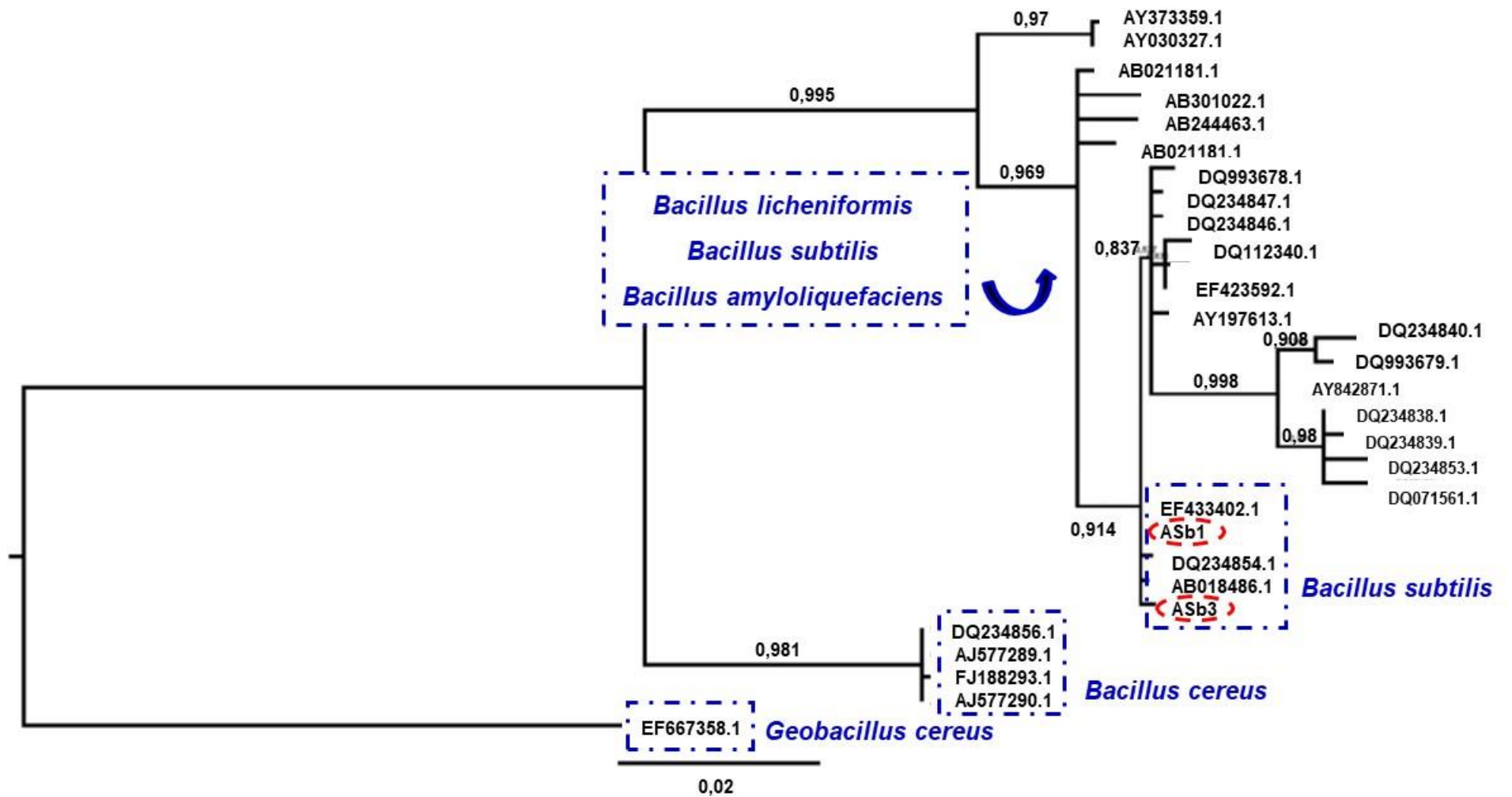


Figura 9. Árvore filogenética dos isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Através da Figura 9 é possível observar que a árvore filogenética está consistente com os dados observados na literatura, onde foi observada uma separação adequada das espécies de micro-organismos, exemplificado pela boa separação dos ramos, também chamados de clados.^{76,77} Como suporte da árvore filogenética, ou seja, para enraizar a árvore, a sequência do *Geobacillus sp.* (EF667358.1) foi utilizada, a qual é uma espécie diferente dos micro-organismos isolados e fez com que essas diferenças fossem evidenciadas. A partir disso, a árvore emerge dois clados principais, o dos *B. cereus* e o outro que possui *Bacillus licheniformis* (DQ234840.1), *B. subtilis* (DQ234854.1), *Bacillus amyloliquefaciens* (AB301022.1), entre outros. Os clados foram agrupados de forma consistente de acordo com os dados que estão em outros trabalhos na literatura, onde estes apresentaram uma boa separação entre as espécies de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*.

É possível destacar que através da árvore filogenética foi possível sugerir que os micro-organismos isolados são *B. subtilis*. Desta forma, a utilização do *B. subtilis* comercial (ATCC 6633) serviu como referência nos ensaios de biorremediação a fim de se obter as condições ótimas para a remoção de cada analito. Este micro-organismo foi escolhido por ser do mesmo gênero dos micro-organismos isolados das águas de produção de petróleo.

Para os micro-organismos isolados, A Sb 1 e A Sb 3, foi observado que a identidade deles se aproximou mais de *B. subtilis*, evidenciada pelo adequado número de confiança (0,914), ou seja, número de replicatas que a mesma separação ocorreu, o que destaca a boa confiabilidade da espécie. Os isolados A Sb 1 e A Sb 3 adequadamente identificados, pertencentes a espécie *B. subtilis*, foram aplicados para as remoções dos analitos nas condições otimizadas visto que, provavelmente, por pertencerem ao mesmo gênero do micro-organismo comercial usado como referência, é esperado um comportamento similar aos micro-organismos isolados das amostras de águas de produção de petróleo.

5.2.4 Testes de sensibilidade a concentrações crescentes de cada analito

Ensaio de sensibilidade foram utilizados para observar o limite de tolerância do micro-organismo comercial (*B. subtilis* ATCC 6633) e dos micro-organismos isolados (A Sb 1 e A Sb 3) frente a elevadas concentrações de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr. Para isso, os micro-organismos isolados e o micro-organismo comercial *B. subtilis*, foram cultivados e, após o cultivo, foi feita a centrifugação para a remoção de todo

conteúdo nutritivo do meio. A concentração dos metais suplementados em meio LB sólido foi realizada na escala de 1, 2, 5 e 10 em relação à concentração escolhida para serem realizados os ensaios de biorremediação. Essa concentração está em concordância com a concentração encontrada para as amostras de águas de produção estudadas no trabalho. A concentração de células foi padronizada para OD em 600 nm 0,8 de absorvância, exemplificada pelo concentração C, como pode ser observado na Figura 10.

Esta concentração de células foi diluída em séries de 10, 100, 1000 e 10000 vezes e, uma alíquota de cada diluição, incluindo a concentrada, foi dispensada em placas de meio sólido LB contendo diferentes concentrações de cada analito, sendo que cada ponto de desenvolvimento de colônia representa a diluição da suspensão de micro-organismos. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 10.

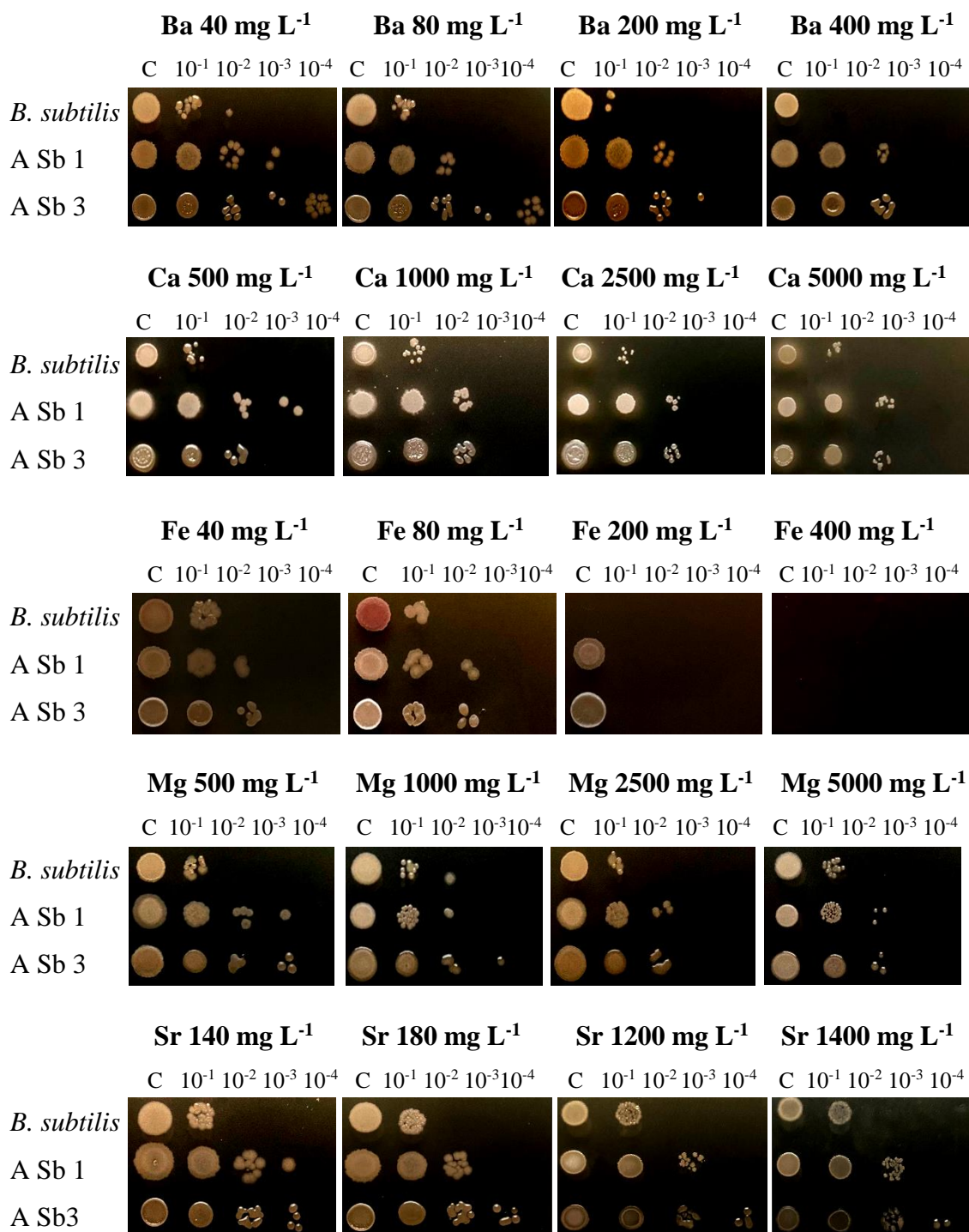


Figura 10. Testes de sensibilidade para *B. subtilis* (referência) e para os micro-organismos isolados em concentrações crescentes de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr. (Cada ponto de desenvolvimento de colônia representa a diluição da suspensão de micro-organismos. C representa OD em 600 nm de 0,8 abs até diluição de 10⁻⁴) (n = 2).

É possível observar, através da Figura 10, que *B. subtilis* apresentou menor resistência ao crescente aumento nas concentrações de todos os analitos, ou seja, os micro-organismos isolados apresentaram maior tolerância a elevadas concentrações de metais quando comparado ao micro-organismo comercial utilizado como referência.

Para Fe, *B. subtilis* não apresentou crescimento em concentrações iguais e superiores a 200 mg L⁻¹, enquanto que para Ba, não apresentou crescimento em concentrações superiores a 200 mg L⁻¹. Para Ca, Mg e Sr o micro-organismo comercial cresceu até a diluição de 100 vezes em todas as concentrações avaliadas.

De modo geral, os micro-organismos isolados das águas de produção de petróleo apresentaram um comportamento similar para todos os analitos. Para Ba, Ca e Mg, tanto o A Sb 1 como o A Sb 3, apresentaram crescimento até a concentração máxima avaliada na diluição de 100 vezes (10⁻²). Para Sr, o micro-organismo A Sb 1 apresentou o mesmo crescimento que para os metais anteriormente citados, enquanto que o micro-organismo A Sb 3 apresentou crescimento até a diluição de 1000 vezes. Para Fe, os micro-organismos isolados apresentaram crescimento até a concentração de 200 mg L⁻¹ quando na concentração de 0,8 abs de OD em 600 nm.

Com o objetivo de verificar as condições de crescimento ideais do *B. subtilis* comercial e dos micro-organismos isolados das amostras foram feitos ensaios em diferentes temperaturas (30 e 37 °C) e o crescimento dos micro-organismos foi avaliado. A temperatura de 30 °C foi avaliada em virtude de ser uma condição ambientalmente utilizada e a temperatura de 37 °C foi também avaliada por se tratar de uma condição ótima de crescimento do *B. subtilis*. Os ensaios de avaliação da temperatura foram feitos a fim de verificar qual seria a temperatura ótima de crescimento dos micro-organismos para posteriormente, efetuar os ensaios de biorremediação na melhor condição. Para isso, foram adicionadas alíquotas dos micro-organismos em placas de LB sólido, sem a presença dos metais (controle branco) e os resultados obtidos estão mostrados na Figura 11.

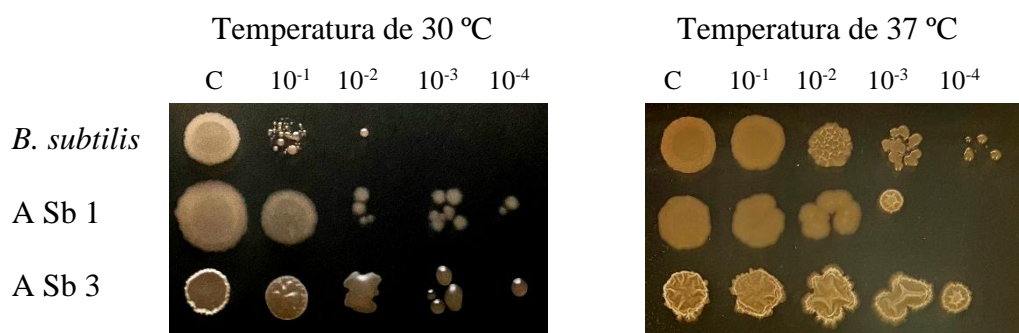


Figura 11. Testes de sensibilidade para *B. subtilis* comercial e para os micro-organismos isolados em placas de LB sólido sem conter concentração de metais em diferentes temperaturas.

Como pode ser observado na Figura 11 o ensaio feito na temperatura de 30 °C foi adequado para o desenvolvimento dos micro-organismos isolados das águas de produção de petróleo, uma vez que esses micro-organismos isolados são ambientais, diferentemente do *B. subtilis* comercial que a temperatura ótima de crescimento foi de 37 °C.

Com isso, foi possível concluir pelos testes de sensibilidade e pelo comparativo entre as temperaturas de aplicação que, em temperaturas de 30 °C os micro-organismos isolados não só conseguem se desenvolver como conseguem suportar concentrações crescentes de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr. Por outro lado, *B. subtilis* comercial não obteve o mesmo desenvolvimento na condição de 30 °C que é o ideal em aplicações ambientais. Devido ao objetivo de aplicação ambiental, os ensaios de biorremediação foram feitos em temperaturas de 30 °C.

5.2.5 Ensaio de biorremediação em soluções sintéticas

Devido à complexidade das águas de produção e dos efeitos indesejáveis de vários constituintes presentes nestas amostras torna-se de grande relevância desenvolver métodos alternativos para o tratamento dessas águas para que se tomem medidas adequadas frente aos riscos ambientais quando descartadas no mar ou quando forem reinjetadas. Devido a isso e as vantagens de se utilizar processos de biorremediação em vista da facilidade de aplicação e manutenção, menor custo associado, eficiência e baixo impacto ambiental, neste trabalho foi feita a avaliação da remoção de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr pelo micro-organismo *B. subtilis* comercial em soluções sintéticas. Cabe destacar que todos estes ensaios foram feitos com o micro-organismo comercial (ATCC 6633) e as

melhores condições foram utilizadas posteriormente para os ensaios com os micro-organismos isolados das águas de produção de petróleo. As avaliações dos processos de biorremediação foram feitas utilizando soluções sintéticas de meios pobres em nutrientes, escolha feita devido ao baixo volume de amostras de águas de produção disponíveis para realização do trabalho. A escolha de utilização de meios pobres em nutrientes foi feita para que estes fossem próximos as características encontradas nas amostras originais.

Para Ca, Fe e Mg, foi utilizado o método de superfície de resposta, a qual se baseia no método de planejamento fatorial que consiste em um grupo de técnicas utilizadas para estudar as relações entre as variáveis. Atualmente, esta ferramenta vem sendo estudada principalmente em processos bioquímicos, onde a relação entre as variáveis precisa ser avaliada. A superfície resposta permite conduzir às condições ótimas experimentais de forma mais rápida que as análises convencionais univariáveis, permitindo avaliar os dados estatísticos de forma mais confiável. Tendo em vista que as bactérias normalmente possuem um pH ótimo para seu crescimento e, com o objetivo de uma aplicação ambiental, a variável pH não foi avaliada, sendo estudados apenas o tempo e a quantidade de células para remoção de Ca, Fe e Mg.

Para Ba e Sr, o planejamento fatorial variando as condições de tempo de interação e quantidade de células não foi feito uma vez que o objetivo deste trabalho era otimizar condições similares ou próximas para a aplicação ambiental destes processos de biorremediação para o tratamento das águas de produção provenientes da extração do petróleo. Para avaliar a remoção de Ba e Sr pelo micro-organismo *B. subtilis* foram feitos ensaios de interação nas condições de remoção anteriormente otimizadas nos planejamentos fatoriais de Ca, Fe e Mg.

Primeiramente, a remoção dos analitos foi feita separadamente com o objetivo de observar o comportamento do *B. subtilis* e para que as condições de cada elemento fossem escolhidas e otimizadas. Foram avaliados também etapas de lavagem e de decomposição da biomassa para que os cálculos de balanço de massa fossem feitos. Após as otimizações das condições de tempo de interação e quantidade de células para cada ensaio de remoção, estas foram aplicadas nas quatro amostras de águas de produção. Após a aplicação do *B. subtilis* comercial nas amostras de águas de produção de petróleo, foram também avaliadas a capacidade de remoção dos micro-organismos isolados, A Sb 1 e A Sb 3, os quais já estão adaptados as condições das amostras, como a baixa disponibilidade de nutrientes encontradas.

Por fim, foram preparadas soluções sintéticas multielementares e foi feita fortificação multielementar nas amostras de águas de produção para avaliar a capacidade tanto do *B. subtilis* comercial como dos micro-organismos isolados das amostras na remoção multielementar dos analitos.

5.2.5.1 Remoção de Fe

Para a avaliação da remoção de Fe pelo *B. subtilis* comercial foi feito um planejamento fatorial 2^2 com duas variáveis independentes, tempo e quantidade de célula, onde o tempo variou de 1 a 60 min e a quantidade de células, expressa por OD em 600 nm, variou de 0,4 a 1,2 abs.

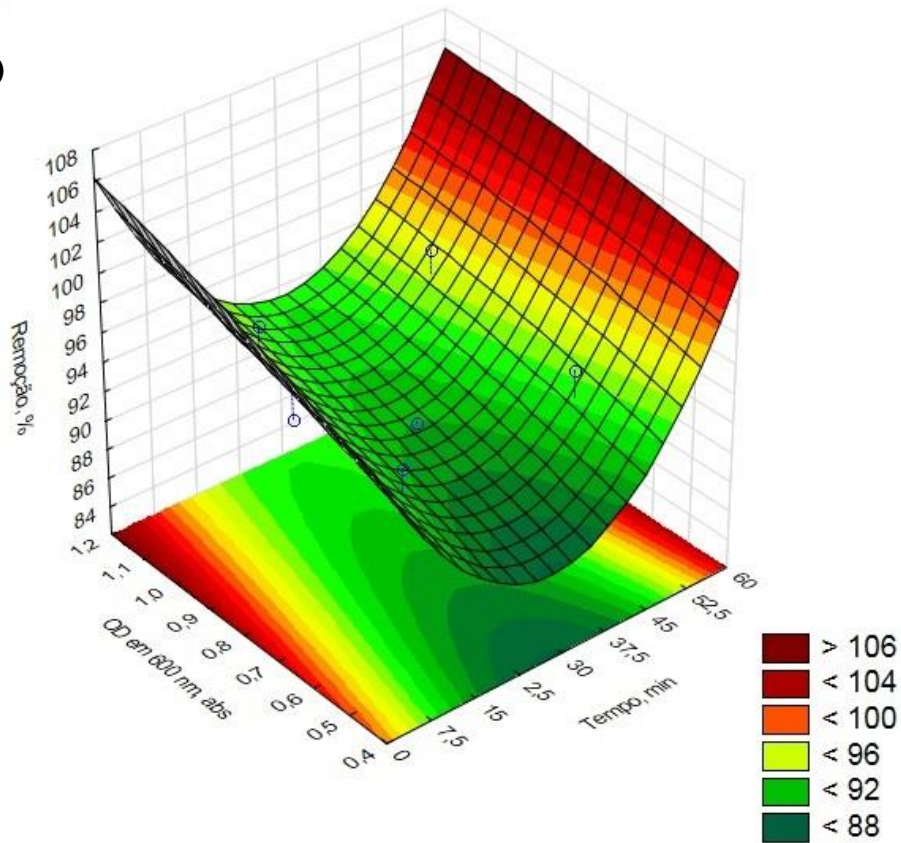
Com base na caracterização das amostras de águas de produção feita anteriormente, a concentração máxima de Fe nas amostras estudadas foi de 40 mg L⁻¹ (amostra D). Os ensaios de interação foram feitos utilizando um meio pobre (0,5% glicose e 0,1% de NH₄NO₃) contendo 40 mg L⁻¹ de Fe e, para isso, 18 mL de meio foi adicionado em um frasco de polipropileno juntamente com 2 mL de células na condição de OD em 600 nm avaliada pelo planejamento fatorial. Posteriormente aos ensaios de interação do micro-organismo com o metal em solução sintética (meio pobre), foram obtidas duas fases: i) sobrenadante e ii) biomassa contendo o micro-organismo. O sobrenadante foi separado para ser utilizado para a determinação de Fe por F AAS para, após, inferir a porcentagem de remoção do metal pelo micro-organismo. Os resultados de remoção obtidos para todos os ensaios do planejamento fatorial estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Matriz com delineamento experimental para a remoção de Fe (média \pm desvio padrão, n = 3). Os ensaios de interação foram feitos utilizando um meio pobre (0,5% glicose e 0,1% de NH_4NO_3) contendo 40 mg L^{-1} de Fe.

Ensaio	Tempo (min)	OD em 600 nm (abs)	Remoção (%)
1	9	0,520	94,1 \pm 0,1
2	51	0,520	95,2 \pm 0,1
3	9	1,08	96,5 \pm 0,1
4	51	1,08	96,5 \pm 0,1
5	1	0,800	95,3 \pm 0,1
6	60	0,800	95,6 \pm 0,2
7	30	0,400	87,2 \pm 1,9
8	30	1,20	91,4 \pm 1,0
9	30	0,800	91,0 \pm 0,1
10	30	0,800	90,9 \pm 0,1
11	30	0,800	91,1 \pm 0,3

A partir dos resultados de remoção encontrados foi possível então obter as superfícies resposta para analisar as melhores condições de tempo e quantidade de células que levam a uma maior remoção de Fe pelo micro-organismo *B. subtilis*. A superfície resposta obtida está mostrada na Figura 12.

(a)



(b)

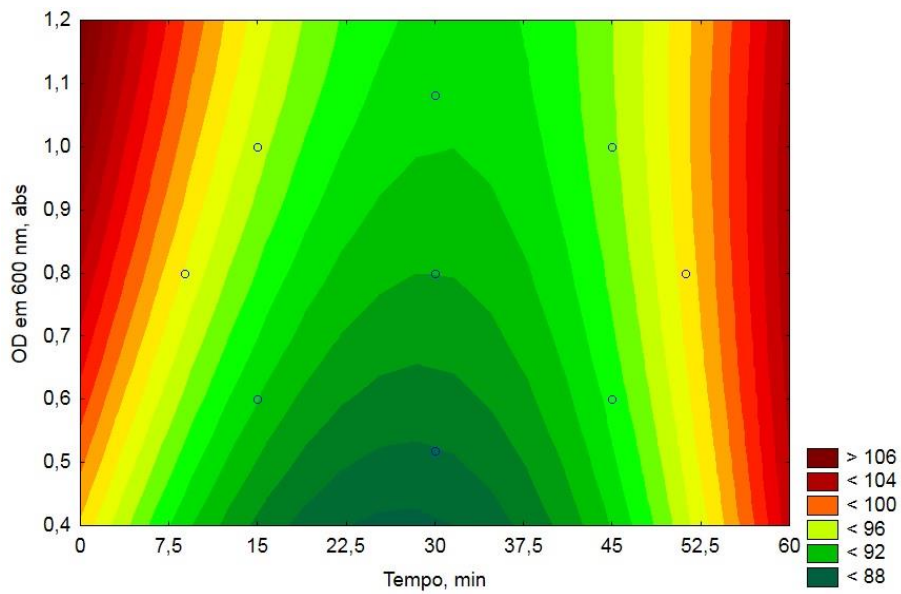


Figura 12. (a) Superfície de resposta para a remoção de Fe pelo *B. subtilis* em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm) e (b) curva de contorno para a remoção de Fe pelo *B. subtilis* em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm).

É possível observar através da Figura 12 que não foi obtida uma superfície de resposta adequada para a remoção de Fe pelo micro-organismo *B. subtilis* comercial, embora seja possível observar a presença de uma região em vermelho mais intenso que indica maiores remoções em tempos extremos. Para a quantidade de células foi possível observar que houve uma influência significativa, onde a região em vermelho se intensifica em condições crescentes de OD em 600 nm.

Como pode ser observado na Tabela 11, para todos os tempos e para todas as quantidades de células há remoções maiores que 90%, exceto para o ensaio 7 (remoção de 87,2%) o qual utilizada a quantidade de células do ponto extremo mais baixo, 0,400 abs de OD em 600 nm. A não obtenção de uma superfície de resposta adequada está relacionada à pequena variação observada nos valores de remoção, embora esses valores apresentem diferenças significativas entre eles (ANOVA, nível de confiança de 95%). Cabe destacar ainda que, com o aumento da quantidade de células (maiores que 0,520 abs) há o favorecimento do aumento na quantidade de Fe sorvido pelo micro-organismo.

Desta maneira, excluindo os pontos extremos, como todos os resultados de remoção se mostraram promissores para a remoção de, aproximadamente, 90% de Fe presente nas soluções, o ensaio 3 (tempo de 9 min e quantidade de células de 1,08 abs) foi escolhido. Este ensaio com remoções de 96,5%, refere-se a um tempo adequado para que o micro-organismo tenha interação com o metal e ao mesmo tempo pode ser considerado um tempo adequado para que seja feita a biorremediação. Diante disso, a condição otimizada para a remoção de Fe pelo *B. subtilis* comercial em soluções sintéticas foi de 9 min de interação e OD em 600 nm de 1,08 abs.

A fim de avaliar a repetitividade dos valores de remoção obtidos para a condição otimizada, o ensaio 3 (tempo de 9 min e OD em 600 nm de 1,08 abs) foi repetido. Os valores de remoção obtidos foram de $89,7 \pm 0,01$, $90,1 \pm 0,01$ e $90,2 \pm 0,01\%$, sendo a média dos valores de $90,0 \pm 0,3\%$. Comparando com a remoção anteriormente obtida ($96,5 \pm 0,1$), tem-se uma concordância de 93,3%, o que destaca a repetitividade adequada do método.

5.2.5.2 Remoção de Ca

Para a determinação da remoção de Ca pelo *B. subtilis* comercial também foram utilizadas as condições de tempo e quantidade de células selecionadas através do planejamento fatorial. Devido a etapa prévia de caracterização das amostras de água de

produção de petróleo, as realizações dos ensaios de interação foram feitas utilizando um meio pobre (0,5% glicose e 0,1% de NH_4NO_3) contendo 500 mg L^{-1} de Ca.

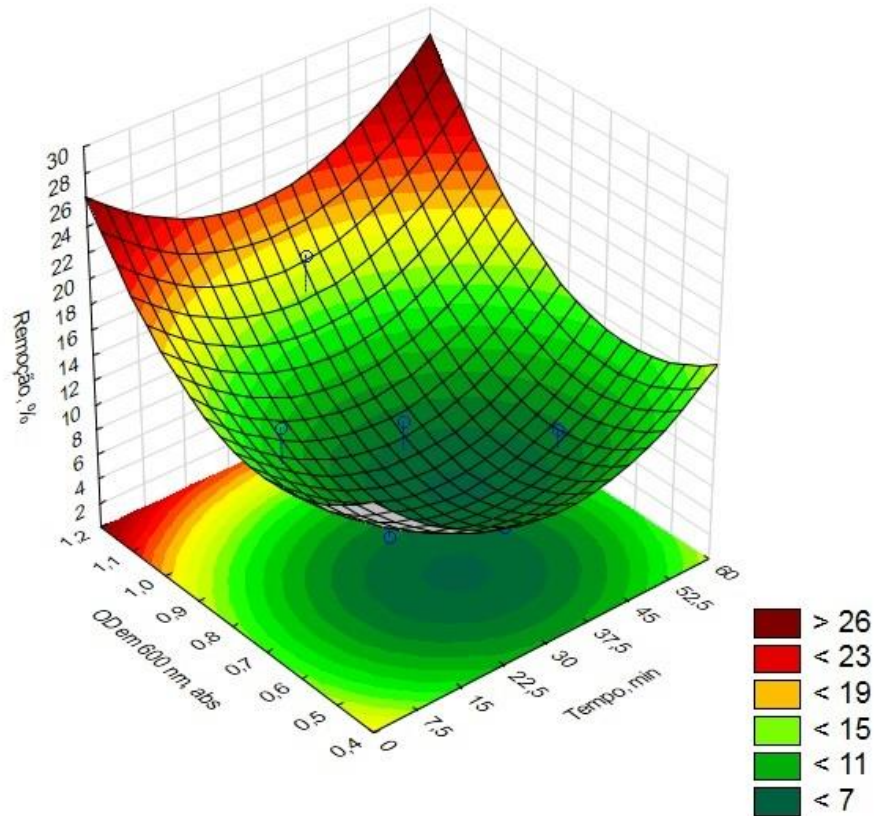
Após os ensaios de interação dos micro-organismos com o metal em solução sintética (meio pobre), também foram obtidas duas fases: i) sobrenadante e ii) biomassa contendo o micro-organismo. O sobrenadante foi separado para a determinação de Ca por F AAS e, após, foi inferida a porcentagem de remoção do metal pelo micro-organismo. Os resultados de remoção obtidos para todos os ensaios estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12. Matriz com delineamento experimental para a remoção de Ca (média \pm desvio padrão, $n = 3$). Os ensaios de interação foram feitos utilizando um meio pobre (0,5% glicose e 0,1% de NH_4NO_3) contendo 500 mg L^{-1} de Ca.

Ensaio	Tempo (min)	OD em 600 nm (abs)	Remoção (%)
1	9	0,520	$7,73 \pm 1,70$
2	51	0,520	$9,84 \pm 0,45$
3	9	1,08	$10,3 \pm 0,4$
4	51	1,08	$13,3 \pm 0,7$
5	1	0,800	$13,7 \pm 4,5$
6	60	0,800	$9,91 \pm 1,00$
7	30	0,400	$6,75 \pm 1,41$
8	30	1,20	$18,1 \pm 4,2$
9	30	0,800	$10,4 \pm 6,6$
10	30	0,800	$7,36 \pm 1,25$
11	30	0,800	$6,34 \pm 1,18$

A partir dos resultados de remoção encontrados, foi possível então obter as superfícies resposta para analisar as melhores condições de tempo e quantidade de células que levam a uma maior remoção de Ca pelo micro-organismo *B. subtilis*. A superfície resposta obtida está mostrada na Figura 13.

(a)



(b)

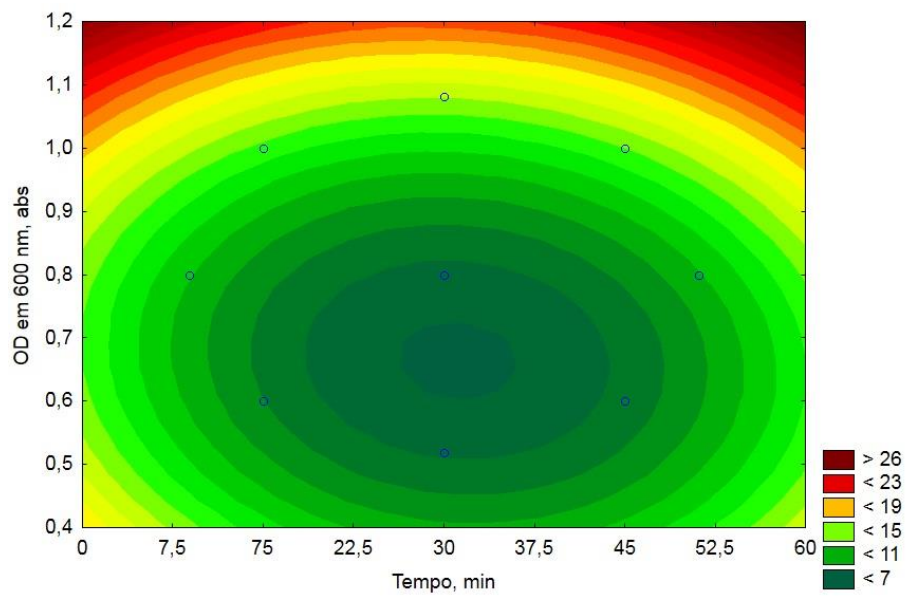


Figura 13. (a) Superfície de resposta para a remoção de Ca pelo *B. subtilis* em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm) e (b) curva de contorno para a remoção de Ca pelo *B. subtilis* em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm).

É possível observar pela Figura 13 que o tempo não teve influência na remoção e, é possível observar ainda que há uma tendência de maiores remoções para quantidades de células maiores que a condição máxima utilizada (OD em 600 nm de 1,20 abs). Desta forma, alguns ensaios adicionais univariados foram feitos utilizando maiores quantidades de células (ODs em 600 nm de 1,20, 1,70, 2,20 e 3,00). O tempo otimizado foi o ponto central de 30 min, uma vez que não foi observado uma região que apresentou resultados superiores para esta variável. Os resultados obtidos utilizando maiores quantidades de células estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Ensaios adicionais univariados para a remoção de Ca pelo *B. subtilis* utilizando tempo de 30 min e diferentes quantidades de células (média \pm desvio padrão, n = 3).

Ensaio	OD em 600 nm (abs)	Remoção (%)
1	1,20	1,06 \pm 0,22
2	1,70	4,43 \pm 1,40
3	2,20	5,28 \pm 0,40
4	3,00	8,01 \pm 0,60

Após a realização dos ensaios univariados utilizando quantidades de células crescentes para a remoção de Ca foi possível observar um aumento expressivo na remoção de Ca quando há um aumento na quantidade de células. Por outro lado, pode-se observar também que, o ensaio 1 não reproduziu o valor de remoção obtido no ensaio 8 do planejamento fatorial (mesmas condições) o qual removeu 18,1% de Ca. Em vista disso, os ensaios univariados foram refeitos e foi avaliada a repetitividade dos valores de remoção encontrados para estes ensaios, como mostrado na Tabela 14.

Tabela 14. Avaliação da repetitividade dos ensaios univariados para a remoção de Ca pelo *B. subtilis* utilizando tempo de 30 min e diferentes quantidades de células (média \pm desvio padrão, n = 3).

Ensaio	OD em 600 nm (abs)	Remoção (%)
1	1,20	4,30 \pm 2,29
2	1,70	4,54 \pm 2,69
3	2,20	5,41 \pm 1,64
4	3,00	0,356 \pm 0,968

Após a avaliação da repetitividade dos ensaios univariados para a remoção de Ca foi possível observar pela Tabela 14 que os ensaios 2 e 3 obtiveram remoções similares as obtidas anteriormente. As remoções obtidas de 4,54 e 5,41% para os ensaios 2 e 3, respectivamente, não apresentaram diferença significativa entre elas (teste *t-student*, nível de confiança de 95%). Entretanto, foi escolhida a condição de 2,20 abs para a quantidade de células devido ao menor desvio padrão entre as replicatas e também devido ao gráfico de superfície apresentar remoções maiores para quantidade maiores de células. Diante disso, a condição otimizada para a remoção de Ca pelo *B. subtilis* em soluções sintéticas foi de 30 min de interação e OD em 600 nm de 2,20 abs.

A fim de avaliar a repetitividade dos valores de remoção obtidos para a condição otimizada, tempo de 30 min e OD em 600 nm de 2,20 abs, os ensaios foram repetidos e os valores de remoção obtidos foram de 4,30 \pm 0,89, 4,54 \pm 0,97 e 5,41 \pm 0,45%, sendo a média dos valores de 4,75 \pm 0,58%. Comparando com a remoção anteriormente obtida (5,41 \pm 1,64), tem-se uma concordância de 87,8%, o que destaca a repetitividade adequada do método.

5.2.5.3 Remoção de Mg

Para a avaliação da remoção de Mg pelo *B. subtilis* comercial, foram utilizadas as condições de tempo e quantidade de células selecionadas através do planejamento fatorial utilizando os mesmos pontos extremos que para Fe e Ca. Em vista da etapa prévia de caracterização das amostras de água de produção de petróleo, as realizações dos ensaios de interação para Mg foram feitas utilizando um meio pobre (0,5% glicose e 0,1% de NH₄NO₃) contendo 500 mg L⁻¹ do metal.

Após os ensaios de interação dos micro-organismos com o metal em solução sintética, foram obtidas duas fases: i) sobrenadante e ii) biomassa contendo o micro-organismo. O sobrenadante foi separado para a determinação de Mg por F AAS e, após, foi inferida a porcentagem de remoção do metal pelo micro-organismo. Os resultados de remoção obtidos para Mg em todos os ensaios estão mostrados na Tabela 15.

Tabela 15. Matriz com delineamento experimental para a remoção de Mg (média \pm desvio padrão, n = 3). Os ensaios de interação foram feitos utilizando um meio pobre (0,5% glicose e 0,1% de NH_4NO_3) contendo 500 mg L^{-1} de Mg.

Ensaio	Tempo (min)	OD em 600 nm (abs)	Remoção (%)
1	9	0,520	0
2	51	0,520	$1,86 \pm 1,94$
3	9	1,08	$6,53 \pm 1,56$
4	51	1,08	$5,70 \pm 3,50$
5	1	0,800	$8,18 \pm 1,56$
6	60	0,800	$2,30 \pm 3,26$
7	30	0,400	$1,40 \pm 1,98$
8	30	1,20	$3,73 \pm 2,20$
9	30	0,800	0
10	30	0,800	0
11	30	0,800	0

A partir dos resultados encontrados através do planejamento fatorial feito para Mg foi possível então obter as superfícies resposta para analisar as melhores tendências de tempo e quantidade de células que levam a uma maior remoção de Mg pelo micro-organismo *B. subtilis*. A superfície resposta obtida está mostrada na Figura 14.

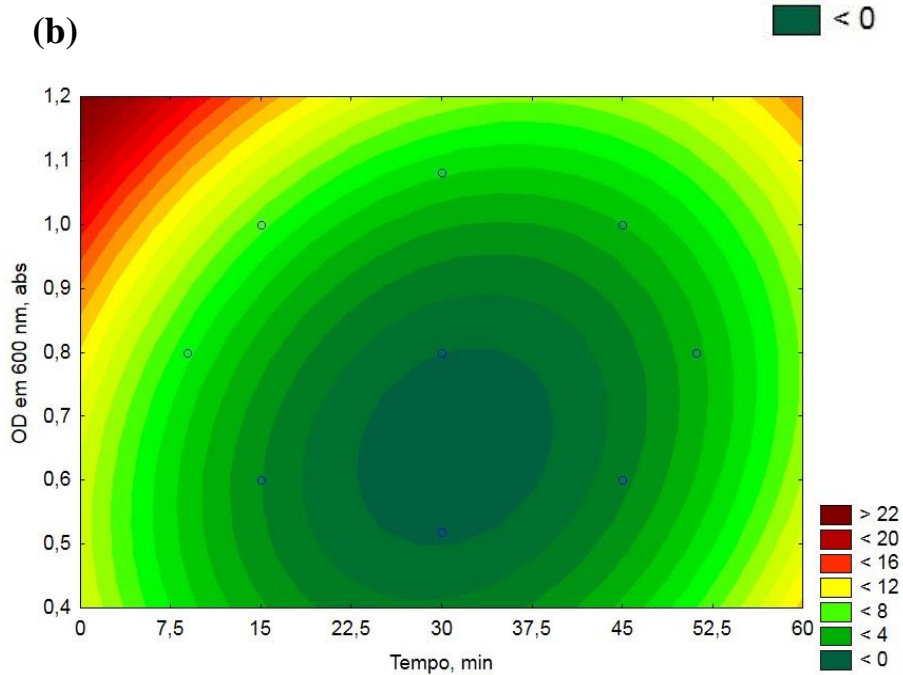
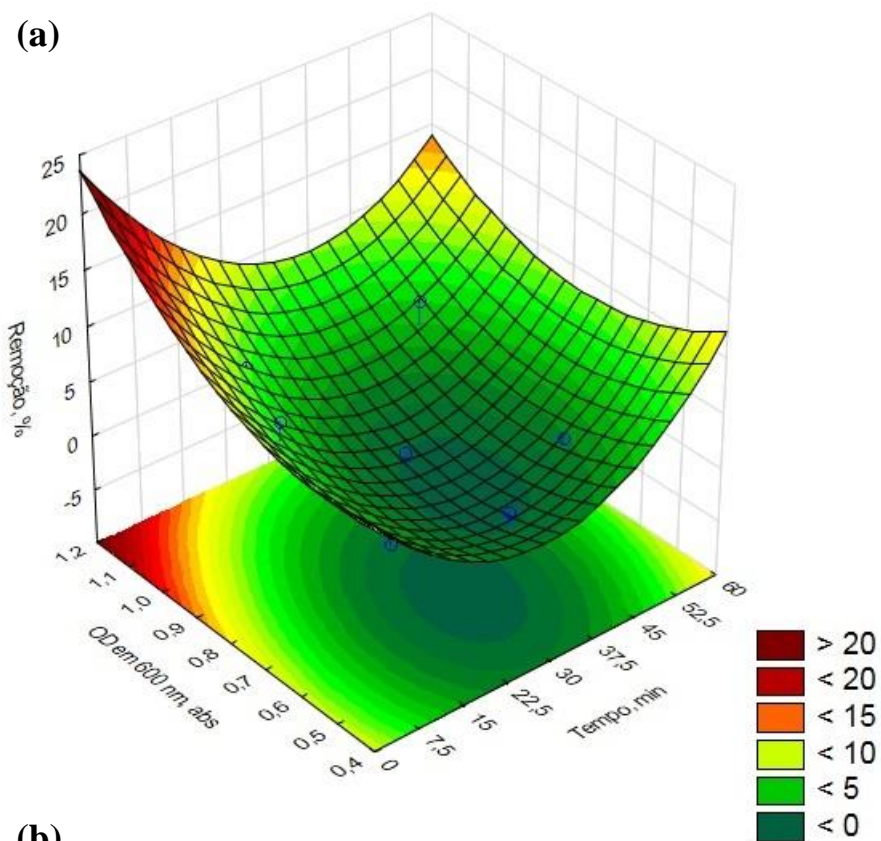


Figura 14. (a) Superfície de resposta para a remoção de Mg pelo *B. subtilis* em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm) e (b) curva de contorno para a remoção de Mg pelo *B. subtilis* em função do tempo e da quantidade de células (expressa em OD em 600 nm).

É possível observar através da Figura 14 uma similaridade com a superfície resposta obtida para a remoção de Ca pelo micro-organismo *B. subtilis*, onde o tempo não teve grande influência na remoção. Através da curva de contorno é possível observar ainda que há uma tendência de maiores remoções para quantidades de células maiores que a condição máxima utilizada (OD em 600 nm de 1,20 abs).

Entretanto, quando se leva em consideração a Tabela 15, é possível observar uma baixa remoção de Mg em todos os ensaios realizados, onde os ensaios 3 e 5 os apresentaram maiores remoções de Mg pelo *B. subtilis*. Desta forma, como o ensaio 5 foi feito utilizando o tempo do ponto extremo de 1 min, este não foi escolhido uma vez que este tempo de interação é extremamente curto. Por outro lado, o ensaio 3 que já foi escolhido como condições de interação otimizadas para a remoção de Fe, é feito utilizando o tempo de 9 min de interação, o qual ainda assim é considerado um tempo de interação rápido e seguro e prático para ser realizado os ensaios.

Com isso, a condição otimizada para a remoção de Mg pelo *B. subtilis* em soluções sintéticas foi de 9 min de interação e OD em 600 nm de 1,08 abs. Salienta-se que esta condição é a mesma condição otimizada para a remoção de Fe pelo mesmo micro-organismo, o que facilita a aplicação desses processos de biorremediação para a remoção de metais concomitantes em amostras reais de águas de produção.

A fim de avaliar a repetitividade dos valores de remoção obtidos para a condição otimizada, tempo de 9 min e OD em 600 nm de 1,08 abs, os ensaios foram repetidos e os valores de remoção obtidos foram de $5,07 \pm 0,99$, $4,85 \pm 0,85$ e $4,93 \pm 1,33\%$. A média dos valores de remoção de Mg pelo micro-organismo foi de $4,95 \pm 0,11\%$. Comparando com a remoção anteriormente obtida ($6,53 \pm 1,56$), tem-se uma concordância de 75,8%, destacando uma boa repetitividade do método.

5.2.5.4 Remoção de Ba

Para a avaliação da remoção de Ba pelo micro-organismo *B. subtilis* comercial e, devido a etapa prévia de caracterização das águas de produção, os ensaios de interação foram feitos utilizando um meio pobre (0,5% glicose e 0,1% de NH_4NO_3) contendo 40 mg L^{-1} de Ba. O planejamento fatorial variando as condições de tempo de interação e quantidade de células não foi feito uma vez que o objetivo deste trabalho visa otimizar condições similares ou próximas para a aplicação ambiental destes métodos de biorremediação para o tratamento das águas de produção obtidas através da extração do petróleo.

Com isso, para avaliar a remoção de Ba pelo micro-organismo *B. subtilis* foram feitos ensaios de interação nas duas condições de remoção anteriormente otimizadas nos planejamentos fatoriais para Ca, Fe e Mg. As condições dos ensaios foram de tempo de 9 min e OD em 600 nm de 1,08 abs e tempo de 30 min e OD em 600 nm de 2,20 abs.

Após os ensaios de interação dos micro-organismos com Ba em solução sintética foram obtidas duas fases: i) sobrenadante e ii) biomassa contendo o micro-organismo. O sobrenadante foi separado para a determinação de Ba utilizando equipamento de ICP-OES e, após, foi inferida a porcentagem de remoção do metal pelo micro-organismo.

A média dos resultados de remoção obtidos para as duas condições de interação avaliadas foram de $32,2 \pm 0,3$ e $55,8 \pm 0,2\%$ para as condições de 9 min e OD em 600 nm de 1,08 abs e 30 min e OD em 600 nm de 2,20 abs, respectivamente. Destaca-se que estes valores de remoção apresentaram diferença significativa entre eles (Teste *t-student*, nível de confiança de 95%).

Com isso, a condição otimizada para a remoção de Ba pelo *B. subtilis* em soluções sintéticas foi de 30 min de interação e OD em 600 nm de 2,20 abs, mesma condição otimizada anteriormente para a remoção de Ca.

A fim de avaliar a repetitividade dos valores de remoção obtidos para a condição otimizada, tempo de 30 min e OD em 600 nm de 2,20 abs, os ensaios foram repetidos e os valores de remoção obtidos foram de $48,8 \pm 0,99$, $51,23 \pm 1,85$ e $51,87 \pm 1,36\%$. A média dos valores de remoção de Ba pelo micro-organismo foi de $50,6 \pm 1,7\%$. Comparando com a remoção anteriormente obtida ($55,83 \pm 0,12\%$), tem-se uma concordância de 90,67%, destacando uma repetitividade adequada do método.

5.2.5.5 Remoção de Sr

Da mesma maneira que foi realizada a avaliação da remoção de Ba pelo micro-organismo *B. subtilis* comercial utilizando as condições otimizadas nos planejamentos fatoriais feitos para Ca, Fe e Mg, foi feita a avaliação da remoção de Sr. Para isso, os ensaios de interação foram feitos utilizando um meio pobre (0,5% glicose e 0,1% de NH_4NO_3) contendo 140 mg L^{-1} de Sr, concentração a qual foi encontrada na etapa prévia de caracterização das amostras de águas de produção utilizadas neste trabalho.

As condições dos ensaios foram de tempo de 9 min e OD em 600 nm de 1,08 abs e tempo de 30 min e OD em 600 nm de 2,20 abs. Após os ensaios de interação em

solução sintética, foram obtidas duas fases: i) sobrenadante e ii) biomassa contendo o micro-organismo. O sobrenadante foi separado para a determinação de Sr por ICP-OES e, após, foi inferida a porcentagem de remoção do metal pelo micro-organismo.

A média dos resultados de remoção obtidos para as duas condições de interação avaliadas foram de $7,48 \pm 0,56$ e $13,7 \pm 0,4\%$ para as condições de 9 min e OD em 600 nm de 1,08 abs e 30 min e OD em 600 nm de 2,20 abs, respectivamente. Destaca-se que estes valores de remoção apresentaram diferença significativa entre eles (Teste *t-student*, nível de confiança de 95%) e, com isso, a condição otimizada para a remoção de Sr pelo *B. subtilis* em soluções sintéticas foi de 30 min de interação e OD em 600 nm de 2,20 abs, condição otimizada anteriormente para a remoção de Ca e Ba.

Para avaliar a repetitividade dos valores de remoção obtidos para a condição otimizada, tempo de 30 min e OD em 600 nm de 2,20 abs, os ensaios foram repetidos e os valores de remoção obtidos foram de $14,0 \pm 2,11$, $14,2 \pm 1,75$ e $15,8 \pm 2,00\%$. A média dos valores de remoção de Sr pelo micro-organismo foi de $14,7 \pm 1,0\%$. Comparando com a remoção anteriormente obtida ($13,7 \pm 0,4\%$), tem-se uma concordância de 107%, destacando uma boa repetitividade do método.

5.2.6 Ensaio de balanço de massa

Alguns trabalhos publicados na literatura relatam a relevância da procura por encontrar técnicas eficientes para o rompimento de células. Dentre os métodos publicados podemos destacar os métodos que incluem a autoclavagem, cavitação hidrodinâmica e homogeneização de alta pressão.⁷⁸⁻⁸⁰

Para inferir a concentração de metal aderido às paredes do micro-organismo ou internalizado nas células (totalmente absorvido), foram avaliadas etapas de lavagem e a etapa de decomposição da biomassa de micro-organismos. Após a etapa de lavagem, um microscópio foi utilizado para visualizar a integridade das paredes celulares do micro-organismo e o sobrenadante foi separado para ser analisado por F AAS (Ca, Fe e Mg) e por ICP-OES (Ba e Sr). Após a lavagem, a etapa de decomposição por via úmida utilizando HNO₃ 50% (v/v) foi feita e os digeridos foram analisados por F AAS e ICP-OES. Considerando os valores encontrados dos analitos em cada uma das etapas (sobrenadante, solução obtida após a lavagem e solução obtida após a decomposição da biomassa), foram feitos os cálculos para o balanço de massa e os resultados foram expressos em porcentagem (%) em termos de recuperação para cada metal analisado.

5.2.6.1 Lavagem da biomassa

Alguns trabalhos publicados na literatura avaliaram a adsorção de Cd na parede celular de *Cupriavidus metallidurans* CH34 em soluções sintéticas.⁶⁵ Para isso, Desaunay and Martins⁶⁵ utilizaram um método de lavagem da biomassa com EDTA. A lavagem com EDTA não foi adequada para determinar a distribuição de Cd nas células bacterianas devido a impossibilidade de realizar lavagens menores que 2 min, a fim de evitar a desestabilização da membrana celular. Em virtude disso, os autores concluíram que a prensagem da biomassa e consequente ruptura da parede celular foi adequada para a avaliação de Cd no micro-organismo, onde observaram que 80% de Cd sorvido pela *Cupriavidus metallidurans* CH34 estava internalizado na célula.⁶⁵

Para avaliar a concentração de metal supostamente aderido na parede celular dos micro-organismos, neste trabalho foram feitos ensaios de lavagem avaliando água à temperatura ambiente, água morna (aproximadamente 35 °C), HNO₃ 2% (v/v) e HNO₃ 10% (v/v) na biomassa obtida após a interação do *B. subtilis* comercial com soluções sintéticas contendo Fe nas condições otimizadas de 9 min e OD em 600 nm de 1,08 abs.

Após a lavagem, a solução foi centrifugada e o sobrenadante foi separado para avaliar a concentração do metal após os ensaios de biorremediação. A biomassa foi separada e foi observada em microscópio para avaliar a integridade das paredes celulares do micro-organismo. Essa etapa foi feita para verificar se as células ainda estavam preservadas e, com isso, inferir se a concentração de metal encontrada após a lavagem seria resultante do metal aderido à parede celular e não da quantidade de metal que foi totalmente absorvido para o interior da célula.

Na Tabela 16 são mostrados os valores obtidos, em %, para o sobrenadante separado após o ensaio de interação e para as lavagens da biomassa com água à temperatura ambiente, água morna e HNO₃ 2 e 10%. Os valores em % do sobrenadante foram calculados em função da concentração inicial de Fe, obtida da solução controle, enquanto que os valores em % das lavagens foram calculados em função da concentração de Fe no sobrenadante.

Tabela 16. Valores obtidos em % para a concentração de Fe após os ensaios de interação do *B. subtilis* e as respectivas lavagens da biomassa (média \pm desvio padrão, n = 3).

Ensaio	Sobrenadante	Lavagens			
		H ₂ O	H ₂ O morna	HNO ₃ 2%	HNO ₃ 10%
1	12,7 \pm 0,8	0,999 \pm 0,012	-	-	-
2	8,98 \pm 0,97	-	8,03 \pm 0,03	-	-
3	9,09 \pm 0,67	-	-	9,06 \pm 0,40	-
4	8,91 \pm 0,88	-	-	-	18,0 \pm 1,2

É possível observar pela Tabela 16 que as lavagens com H₂O morna e HNO₃ 2% resultaram em valores similares, cerca de 8,5% de Fe encontrado. Enquanto que para HNO₃ 10% uma maior concentração de Fe foi lixiviada das células do *B. subtilis* comercial (cerca de 18% do metal presente na biomassa). Para essa condição de lavagem ser escolhida, foi preciso observar as imagens obtidas através de microscópio para avaliar a integridade da parede celular do micro-organismo, ou seja, para verificar se a concentração de Fe removida era proveniente apenas da parede celular do micro-organismo.

Após analisar as imagens, foi possível observar que a parede celular do micro-organismo *B. subtilis* permaneceu intacta com as lavagens todas as soluções investigadas. No entanto, estudos adicionais devem ser feitos utilizando MEV para obter imagens mais precisas e garantir, com maior confiabilidade, se o uso de ácido nítrico diluído (2 e 10%) e água morna não rompem as paredes celulares. Cabe destacar que não foram encontrados trabalhos na literatura onde a lavagem das células é feita com ácido nítrico diluído a fim de manter a integridade das células e apenas sorver o material aderido na parede celular. Na maioria dos casos, a lavagem é feita apenas com água ou EDTA.⁶⁵

5.2.6.2 Decomposição da biomassa

Para avaliar a concentração dos metais internalizados é preciso utilizar um método adequado para que as paredes celulares sejam rompidas e o metal absorvido para o interior da célula possa ser transferido para a solução e, posteriormente, determinado.

Existem várias formas de romper as paredes celulares para expor os metais como: métodos mecânicos (homogeneização de alta pressão, moinho de esferas, prensagem, etc) e métodos não mecânicos (físicos: autoclavagem, cavitação hidrodinâmica, choque osmótico, etc; químicos e biológicos: enzimas).^{65,78-81} Os métodos mecânicos se baseiam na quebra da parede celular pela força de cisalhamento e são os métodos frequentemente utilizados por fornecerem um adequado rendimento e eficiência na ruptura das paredes celulares. O método de homogeneização de alta pressão é um método muito utilizado em escala industrial enquanto que o moinho de esferas é usualmente utilizado em escala laboratorial. O moinho de esferas é baseado na agitação de pequenas esferas de vidro, aço ou cerâmica, juntamente com a suspensão de células em altas velocidades.⁸¹

Desaunay *and* Martins⁶⁵ avaliaram a concentração de Cd internalizado pela *Cupriavidus metallidurans* CH34 em soluções sintéticas. Para isso, após os ensaios de interação da bactéria com o metal, a biomassa foi separada por centrifugação e, esta biomassa foi prensada. A ruptura física da parede celular da bactéria ocorre devido a pressão exercida na formação do comprimido. Os autores concluem que este método foi eficiente para a avaliação da concentração de Cd na bactéria, onde eles concluem que 80% de Cd estava internalizado no citoplasma.⁶⁵

Em outro trabalho⁸², o método mecânico com esferas de vidro foi utilizado para a lise da membrana celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para avaliar a concentração de nanopartículas de Se. Para isso, a levedura juntamente com as esferas de vidro foram agitadas e posteriormente foi feito um tratamento adicional em banho de ultrassom por 10 min. Após este tratamento, a mistura foi filtrada e diluída com água para ser analisada por ICP-MS. Os autores mencionam que devido a alta rigidez das paredes celulares das leveduras, muitas vezes as decomposições enzimáticas são utilizadas para a lise, entretanto, eles observaram que a utilização deste método mecânico com uso de esferas de vidro foi eficiente na lise da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para posterior análise de Se que estava internalizado.⁸²

Os métodos não mecânicos estão divididos em três: físicos, químicos e biológicos. Os métodos físicos fazem uso de uma força externa para a ruptura das paredes celulares. Essas forças incluem calor, pressão e energia sonora. Os métodos ultrassônicos têm sido amplamente utilizados e são bem conhecidos em laboratórios. Este método é baseado na formação e subsequente ruptura de bolhas. Essas bolhas de cavitação podem ser formadas reduzindo a pressão local, a qual pode ser feita aumentando a velocidade ou vibração ultrassônica. Após a redução da pressão, há o colapso das bolhas, levando a

uma grande quantidade de energia mecânica liberada na forma de onda que é propagada no meio, que irá fazer com que a parede celular seja rompida.^{78,80,81}

Li *et al.*⁸⁰ avaliaram a lise de *B. subtilis* utilizando uma sonda de sonicação para a determinação de U por ICP-MS. Os autores concluíram que a sonicação (por 10 min em banho de ultrassom) foi adequada para a lise das bactérias onde foram liberadas as espécies intracelulares que estavam ligadas ao U das bactérias, ocasionando um aumento de sinal no equipamento.⁸⁰

Por outro lado, cabe destacar a importância de avaliar os métodos de ruptura celular tendo em vista que dependendo do método utilizado para determinados tipos de micro-organismos, a ruptura pode não ser eficiente. Starke *et al.*⁷⁸ observaram que após o tratamento em banho de ultrassom por 10 min, a parede celular de fungos e bactérias gram positivas não eram totalmente rompidas e a maioria das células se mantinham intactas. Por outro lado, bactérias gram negativas, que por sua vez, possuem menor rigidez na parede celular, apresentavam as células totalmente rompidas.

Há na literatura um trabalho que utilizou a decomposição por via úmida em bloco digestor com HNO₃ para a destruição da biomassa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a determinação de Na, Mg, Fe, Cu, Zn, Se e In por ICP-MS.⁸³ Para isso, os autores utilizaram cerca de 200 mg de biomassa de levedura, 2 mL de HNO₃ concentrado e 0,4 mL de H₂O₂. As amostras foram aquecidas à 150 °C por 20 min. As amostras foram diluídas em água ultrapura e as soluções finais foram adequadas para a análise multielementar por ICP-MS.⁸³ Neste trabalho, após a lavagem das células com HNO₃ 10%, a decomposição por via úmida da biomassa foi feita em bloco digestor utilizando HNO₃ 50% até a completa decomposição da matéria orgânica e solubilização dos componentes inorgânicos de forma a romper a parede celular.

Após a decomposição, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno e diluídos a 15 mL com água ultrapura para análise por F AAS.

5.2.6.3 Cálculos de balanço de massa

Após a interação do *B. subtilis* comercial com os metais em soluções sintéticas, a etapa de lavagem e a etapa de decomposição da biomassa, foram feitos os cálculos para o balanço de massa. Os valores em % do sobrenadante foram calculados em função da concentração inicial de cada analito e, obtida da solução controle, enquanto que os valores em % das lavagens e da decomposição foram calculados em função da

concentração de cada analito no sobrenadante. Foram então calculadas a recuperação para cada metal analisado, como pode ser observado na Figura 15.

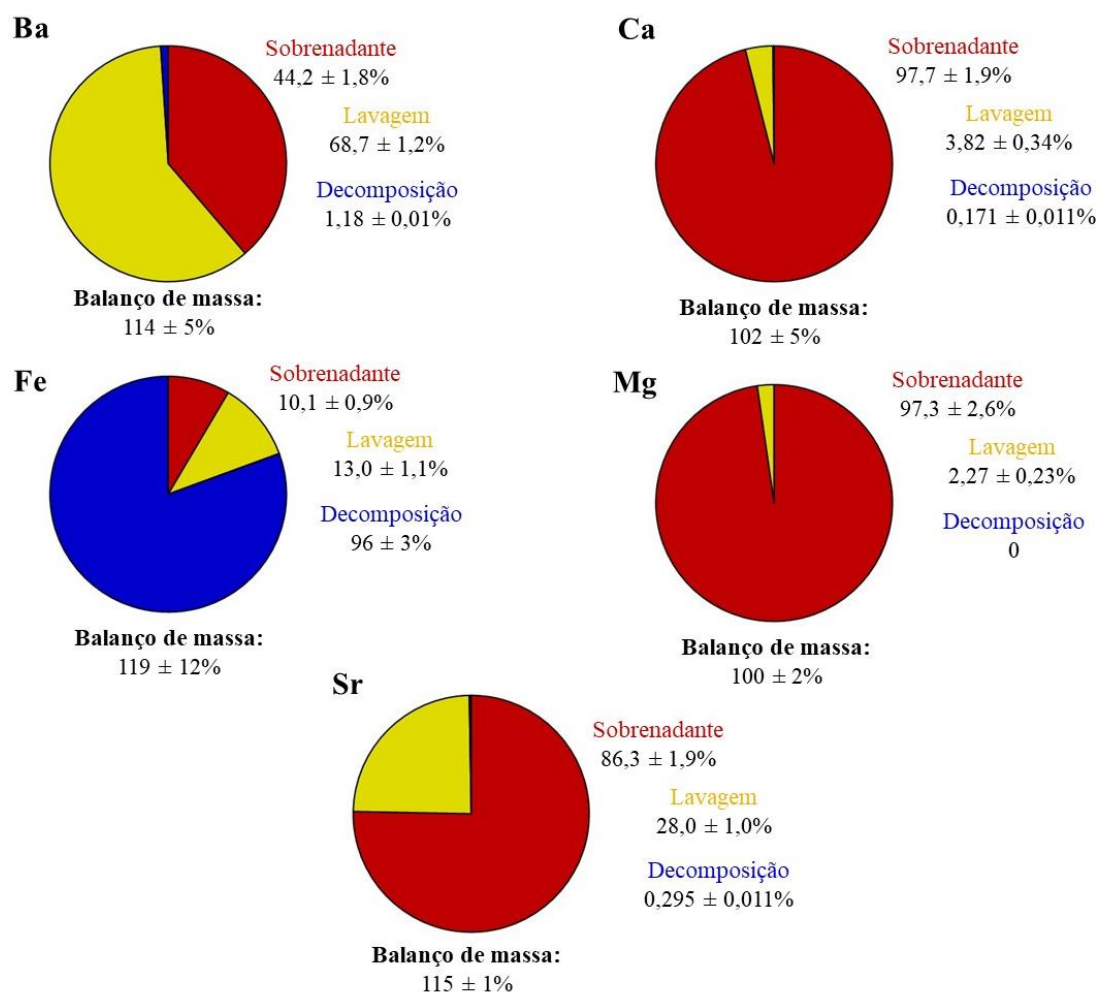


Figura 15. Gráficos de balanço de massa após as interações do *B. subtilis* com os respectivos analitos nas soluções sintéticas utilizando as condições otimizadas nos planejamentos fatoriais (média ± desvio padrão, n = 3). As partes dos gráficos na cor **vermelha** referem-se aos valores em % obtidos no sobrenadante, na cor **amarela** aos valores obtidos na etapa de lavagem e na cor **azul** referem-se aos valores obtidos na etapa de decomposição.

É possível observar pela Figura 15 os valores adequados de recuperação do balanço de massa encontrados para todos os analitos. Para Fe, é possível destacar que 96% do analito encontra-se internalizado no micro-organismo (observado pela etapa de decomposição) e, apenas cerca de 10% encontra-se aderido na parede celular (observado

pela etapa de lavagem). Em vista disso, a remoção de Fe pode estar relacionada à interação da célula com o metal, sendo necessário um equilíbrio entre a capacidade de sobrevivência em meios contendo altas concentrações de metais com a não-expulsão dos íons de Fe, evidenciando a internalização desse metal. Isto pode estar relacionado também pelo Fe ser considerado um metal essencial para as células, sendo utilizado para seu crescimento e desenvolvimento.⁸⁴ Para complementar esta hipótese, pode-se descartar os resultados obtidos na Figura 10 que mostram que as bactérias são intolerantes à elevadas concentrações de Fe (iguais e superiores a 200 mg L⁻¹). Isso poderia estar relacionado ao fato de que elas absorvem e internalizam o Fe, o que também pode ser evidenciado pela coloração avermelhada adquirida pelas colônias.

Destaca-se para Ba, analito o qual observou-se remoção de aproximadamente 50%, que a maior parte desse elemento foi lixiviado na etapa de lavagem, o que evidencia que o metal está fracamente retido na célula, podendo estar adsorvido na parede celular do micro-organismo.

Para os demais metais, foi observado remoções inferiores a 13,7%, e a maior parte, quase que na sua totalidade, a concentração de Ca, Mg e Sr removida foi lixiviada na etapa de lavagem, demonstrando então que estes elementos não estão internalizados no micro-organismo.

5.2.7 Ensaios de biorremediação nas amostras de águas de produção

Com o objetivo de aplicação do *B. subtilis* de referência na remoção de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr nas quatro amostras de águas de produção de petróleo disponíveis para a realização deste trabalho, as condições otimizadas nos ensaios de biorremediação para as amostras sintéticas foram aplicadas nas amostras A, B, C e D. Primeiramente, foram aplicadas as condições otimizadas de tempo e quantidade de micro-organismos nas amostras considerando as concentrações dos metais previamente determinadas na etapa de caracterização das amostras. Entretanto, foi verificado que parte da concentração dos analitos estava presente no material particulado em suspensão presente nas amostras, o que dificultou os ensaios de biorremediação. Em função disso, as amostras de águas de produção foram centrifugadas e, o sobrenadante foi separado para ser utilizado nos ensaios de biorremediação os quais foram fortificados com os analitos. Foram adicionados 40, 500, 40, 500 e 140 mg L⁻¹ para Ba, Ca, Fe, Mg e Sr, respectivamente. Cabe destacar que foi feita a determinação dos metais por F AAS no sobrenadante após

a fortificação e os valores encontrados foram levados em consideração para os cálculos de remoção e balanço de massa.

Para os ensaios de interação com o micro-organismo *B. subtilis* comercial, uma alíquota de cada amostra fortificada foi adicionada em frascos de polipropileno juntamente com a quantidade de células otimizadas por cada planejamento fatorial. Após as interações, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado para análise.

Nas Tabela 17, 18, 19 e 20 são mostrados os valores de remoção para todos os analitos nas amostras de águas de produção A, B, C e D, respectivamente, assim como são mostrados os valores em % dos analitos presentes nas soluções após a etapa de lavagem e a decomposição da biomassa. Os valores em % da remoção e do sobrenadante foram calculados em função da concentração inicial de cada analito, enquanto que os valores em % das etapas de lavagens e de decomposição foram calculados em função da concentração de cada analito no sobrenadante.

Tabela 17. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do *B. subtilis* com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo A (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	63,1 \pm 1,3	36,9 \pm 1,4	47,0 \pm 0,4	25,0 \pm 1,4	109 \pm 1
Ca	4,05 \pm 0,31	96,0 \pm 2,8	3,69 \pm 0,33	0	99,6 \pm 0,8
Mg	3,55 \pm 0,73	96,4 \pm 1,9	3,07 \pm 1,39	0	99,5 \pm 0,9
Ba	49,0 \pm 1,6	51,0 \pm 1,2	48,7 \pm 0,6	0	99,7 \pm 2,3
Sr	7,13 \pm 0,89	92,9 \pm 1,2	4,36 \pm 0,04	0	97,2 \pm 4,7

Tabela 18. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do *B. subtilis* com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo **B** (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	72,0 \pm 1,1	28,0 \pm 0,3	38,6 \pm 1,3	42,0 \pm 2,3	109 \pm 5
Ca	4,49 \pm 0,98	95,5 \pm 1,8	6,19 \pm 0,57	0	102 \pm 1
Mg	5,28 \pm 1,01	94,7 \pm 2,3	3,61 \pm 0,43	0	98,3 \pm 0,6
Ba	38,2 \pm 1,0	61,8 \pm 1,2	36,9 \pm 0,39	0	98,7 \pm 0,5
Sr	8,57 \pm 1,0	91,4 \pm 1,0	13,7 \pm 1,3	0,27 \pm 0,07	105,4 \pm 1,1

Tabela 19. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do *B. subtilis* com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo **C** (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	91,1 \pm 3,3	8,83 \pm 1,02	49,1 \pm 1,7	49,9 \pm 1,1	108 \pm 3
Ca	3,68 \pm 0,44	96,3 \pm 4,6	3,36 \pm 1,23	0	99,7 \pm 0,6
Mg	1,04 \pm 0,06	99,0 \pm 2,5	2,56 \pm 0,98	0	102 \pm 1
Ba	23,3 \pm 1,6	76,7 \pm 1,5	22,8 \pm 1,88	0	100 \pm 1
Sr	6,86 \pm 1,09	93,1 \pm 1,1	3,88 \pm 0,73	0	96,8 \pm 0,3

Tabela 20. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do *B. subtilis* com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo **D** (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	71,1 \pm 0,8	28,9 \pm 1,03	54,0 \pm 1,4	23,0 \pm 1,1	106 \pm 9
Ca	3,33 \pm 0,43	96,7 \pm 1,77	3,59 \pm 0,45	0	100 \pm 2
Mg	5,29 \pm 0,98	94,7 \pm 2,2	2,93 \pm 0,88	0	97,6 \pm 1,4
Ba	34,4 \pm 1,1	65,6 \pm 1,2	29,8 \pm 0,89	0	95,4 \pm 6,2
Sr	8,93 \pm 1,01	91,1 \pm 3,1	4,39 \pm 1,01	0	95,5 \pm 1,0

Para fins de comparação visual, na Figura 16 é mostrada a remoção de cada analito nas quatro amostras de águas de produção utilizando o micro-organismo *B. subtilis*.

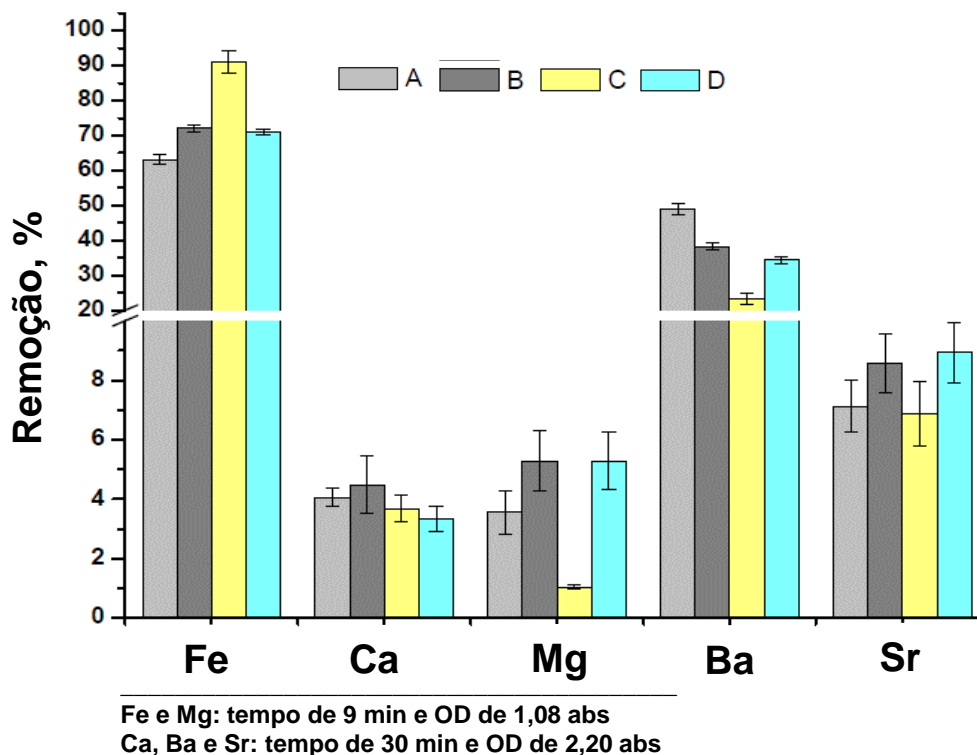


Figura 16. Valores, em %, de remoção após as interações do *B. subtilis* com os respectivos analitos nas quatro amostras de água de produção de petróleo estudadas.

É possível observar pelas Tabelas 17, 18, 19 e 20 e pela Figura 16 que, para Fe, apenas na amostra C que foi reproduzido os valores de remoção ($91,1 \pm 3,3\%$) muito próximos aos obtidos nas soluções sintéticas ($90,0 \pm 0,3\%$). Isto pode ser devido ao fato de que a amostra C é a amostra que possui o menor teor de carbono orgânico total ($12,0 \pm 2,2 \text{ mg L}^{-1}$), fazendo com que essa matriz seja similar às soluções sintéticas preparadas. Nas amostras A, B e D foram observados valores próximos de remoção ($63,1 \pm 1,3$, $72,0 \pm 1,1$ e $71,1 \pm 0,8\%$, respectivamente), sendo que a amostra A a qual foi obtido o menor valor de remoção é a amostra com maior teor de carbono orgânico total ($155 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$). Cabe destacar que as águas de produção de petróleo são caracterizadas por serem uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos, dentre eles sais, óleo dissolvido e disperso, metais, aditivos químicos e ainda podem conter agentes antimicrobianos adicionados na água de reinjeção (a qual é usada para facilitar o escoamento do óleo). Todos esses constituintes podem estar relacionados a variação na remoção de alguns metais em algumas amostras de águas de produção de petróleo.³

Para Ba, é possível observar que os valores de remoção encontrados para as amostras foram de $49,0 \pm 1,6$, $38,2 \pm 1,0$, $23,3 \pm 1,6$ e $34,4 \pm 1,1\%$, respectivamente para as amostras A, B, C e D. O valor de remoção encontrado para a amostra A é similar ao valor encontrado para as soluções sintéticas ($50,6 \pm 1,7\%$).

Para os demais elementos, Ca, Mg e Sr, remoções inferiores a 10% foram encontradas para todas as amostras, concordando com as remoções obtidas para as soluções sintéticas, exceto para Sr que nas soluções sintéticas foi encontrado $14,7 \pm 1,0\%$.

5.2.8 Ensaios de biorremediação nas amostras de águas de produção de petróleo utilizando os micro-organismos isolados

Para avaliar o potencial de aplicação dos micro-organismos isolados das amostras de águas de produção de petróleo, A Sb 1 e A Sb 3, na remoção de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr, as amostras A e C foram selecionadas devido a maior remoção de Ba e Fe. Para isso, as condições otimizadas anteriormente nas soluções sintéticas para cada analito foram aplicadas nos ensaios de biorremediação.

As amostras A e C foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado e diluído 10 vezes. Similar aos ensaios de biorremediação nas amostras de águas de produção utilizando *B. subtilis*, as amostras diluídas foram separadas em várias alíquotas para a fortificação de cada analito. Foram adicionados 40, 500, 40, 500 e 140 mg L⁻¹ para Ba, Ca, Fe, Mg e Sr, respectivamente.

Para a interação com os micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3, uma alíquota de cada amostra fortificada foi adicionada em frascos de polipropileno, juntamente com 2 mL de células na condição de OD em 600 nm otimizada por cada planejamento fatorial. Os frascos contendo a interação célula-amostra foram incubados em agitador orbital e, após a interação, as células foram separadas por centrifugação e o sobrenadante foi separado para análise.

A biomassa de micro-organismos foi armazenada para posterior lavagem e decomposição, com o objetivo de calcular o balanço de massa para cada metal.

Nas Tabela 21 e 22 são mostrados os valores de remoção para todos os analitos na amostra de água de produção de petróleo A, utilizando os micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3. São mostrados, também, os valores em % dos analitos presentes nas soluções após a etapa de lavagem e a decomposição da biomassa. Os valores em % da remoção e do sobrenadante foram calculados em função da concentração inicial de cada

analito, obtida a partir da solução controle, enquanto que os valores em % das etapas de lavagens e de decomposição foram calculados em função da concentração de cada analito no sobrenadante.

Tabela 21. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 1 com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo A (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	75,3 \pm 2,2	24,6 \pm 1,9	55,0 \pm 2,1	22,3 \pm 0,7	102 \pm 2
Ca	0,72 \pm 0,01	99,1 \pm 3,1	2,89 \pm 0,58	0	102 \pm 2
Mg	0,76 \pm 0,08	98,9 \pm 2,7	1,96 \pm 0,04	0	101 \pm 1
Ba	32,0 \pm 1,9	68,2 \pm 1,9	40,9 \pm 1,0	0	109 \pm 3
Sr	4,84 \pm 0,84	94,9 \pm 1,8	3,36 \pm 0,89	0	98,3 \pm 2,4

Tabela 22. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 3 com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo A (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	74,4 \pm 0,8	25,9 \pm 0,9	52,0 \pm 0,4	22,0 \pm 1,1	100 \pm 2
Ca	1,44 \pm 0,45	98,5 \pm 2,7	4,69 \pm 0,22	0	103 \pm 1
Mg	1,52 \pm 0,22	98,4 \pm 1,7	2,07 \pm 0,34	0	101 \pm 1
Ba	49,0 \pm 1,3	51,1 \pm 1,2	57,1 \pm 0,8	0	108 \pm 3
Sr	7,13 \pm 0,67	93,0 \pm 1,8	8,26 \pm 0,75	0	101 \pm 2

Para melhor comparação, na Figura 17 é mostrada a remoção de cada analito na amostra de água de produção de petróleo A utilizando os valores de remoção encontrados anteriormente para a interação com *B. subtilis* comercial, usado como referência, e os valores de remoção encontrados nesta etapa para os micro-organismos isolados.

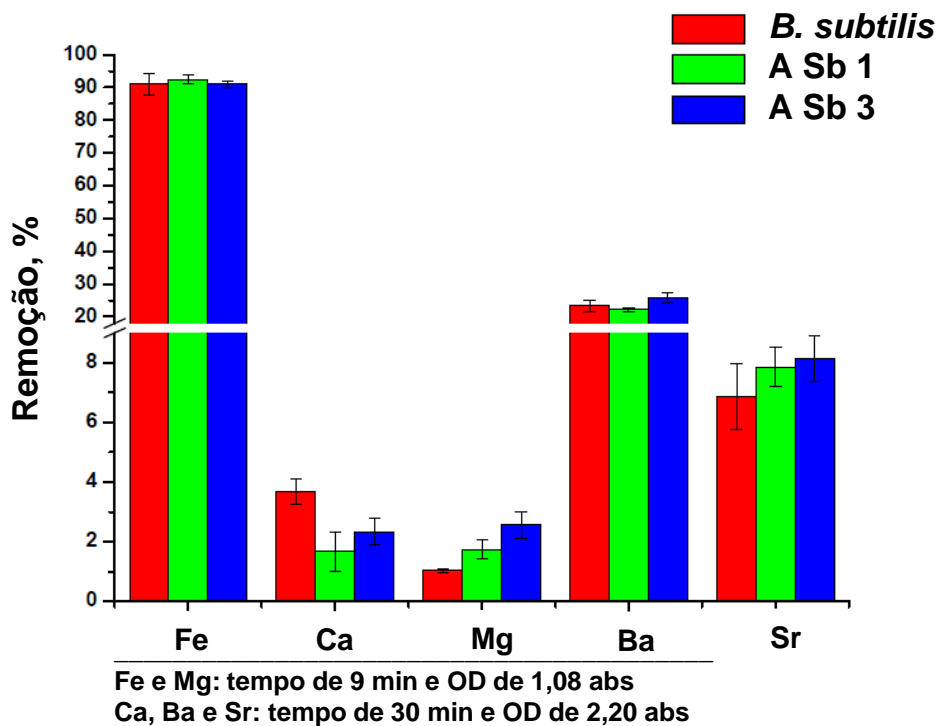


Figura 17. Valores, em %, de remoção após as interações do *B. subtilis* comercial e dos micro-organismos isolados com os analitos na amostra de água de produção de petróleo A.

Nas Tabela 23 e 24 são mostrados os valores de remoção para todos os analitos na amostra de água de produção de petróleo C, utilizando os micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3. São mostrados, também, os valores em % dos analitos presentes nas soluções após a etapa de lavagem e a decomposição da biomassa. Os valores em % da remoção e do sobrenadante foram calculados em função da concentração inicial de cada analito, obtida a partir da solução controle, enquanto que os valores em % das etapas de lavagens e de decomposição foram calculados em função da concentração de cada analito no sobrenadante.

Tabela 23. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 1 com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo C (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	92,4 \pm 1,4	7,39 \pm 0,54	50,1 \pm 2,8	49,7 \pm 1,7	107 \pm 3
Ca	1,68 \pm 0,65	98,3 \pm 5,1	5,36 \pm 0,64	0	104 \pm 2
Mg	1,74 \pm 0,32	98,3 \pm 2,6	1,26 \pm 0,23	0	100 \pm 1
Ba	22,2 \pm 0,6	77,7 \pm 2,4	18,4 \pm 0,3	0	96,2 \pm 2,1
Sr	7,86 \pm 0,65	92,1 \pm 2,4	2,88 \pm 0,21	0	94,9 \pm 2,6

Tabela 24. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 3 com os respectivos analitos na amostra de água de produção de petróleo C (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	91,0 \pm 1,1	8,99 \pm 0,32	49,1 \pm 1,1	46,1 \pm 2,5	104 \pm 2
Ca	2,34 \pm 0,43	97,6 \pm 4,8	1,65 \pm 0,43	0	99,3 \pm 1,1
Mg	2,56 \pm 0,43	97,3 \pm 3,8	1,32 \pm 0,65	0	98,7 \pm 1,2
Ba	25,7 \pm 1,6	74,4 \pm 4,0	17,7 \pm 0,9	0	92,0 \pm 2,1
Sr	8,13 \pm 0,76	91,9 \pm 2,4	2,78 \pm 0,43	0	94,8 \pm 0,8

Para fins de comparação, na Figura 18 é mostrada a remoção de cada analito na amostra de água de produção de petróleo C utilizando os valores de remoção encontrados anteriormente para a interação com *B. subtilis* comercial, usado como referência, e os valores de remoção encontrados nesta etapa para os micro-organismos isolados.

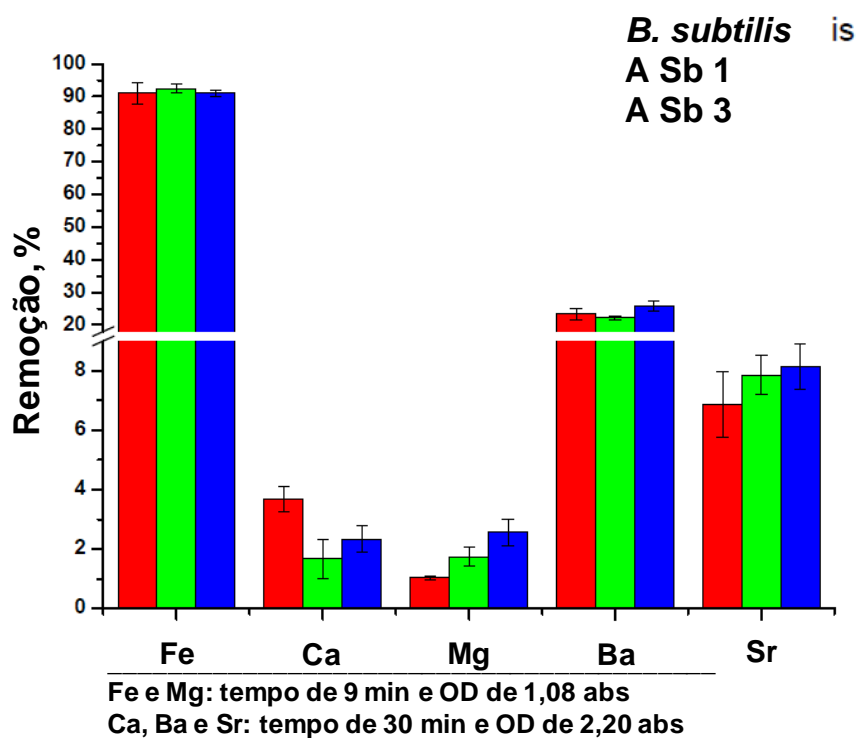


Figura 18. Valores, em %, de remoção após as interações do *B. subtilis* e dos micro-organismos isolados com os analitos na amostra de água de produção de petróleo C.

É possível observar pelas Tabela 21, 22, 23 e 24 e nas Figura 17 e 18 um comportamento similar ocorrido com a utilização do *B. subtilis* comercial e dos micro-organismos isolados (A Sb 1 e A Sb 3) nos ensaios de remoção nas amostras de águas de produção. Para a amostra A, as remoções de Fe foram próximas a 75% enquanto que para a amostra C foram cerca de 91%. Cabe destacar que o comportamento dos micro-organismos, tanto *B. subtilis* comercial como os isolados, foi semelhante em função das diferenças características das amostras (teor de carbono orgânico extremamente diferente).

Para Ba na amostra A, é possível observar uma variação no comportamento dos micro-organismos isolados na remoção do metal. O micro-organismo A Sb 3 reproduziu os valores de remoção encontrados quando utilizando *B. subtilis* comercial nos processos de remoção da amostra, cerca de 49%. Enquanto que com a utilização do micro-organismos A Sb 1 foi obtido remoção inferior, cerca de 32%. Para Ba na amostra C, os valores de remoção encontrados foram similares para os três micro-organismos avaliados, aproximadamente 23% de remoção.

Para os demais elementos, Ca, Mg e Sr, remoções inferiores a 10% foram encontradas para as amostras utilizando os três micro-organismos avaliados neste trabalho, embora seja possível observar uma ligeira melhora nos valores de remoção quando utilizado o micro-organismo A Sb 3 quando comparado ao micro-organismo A Sb 1.

5.2.9 Ensaio de biorremediação em soluções multielementares utilizando *B. subtilis* comercial, A Sb 1 e A Sb 3

Para avaliar o potencial de aplicação dos micro-organismos na remoção de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr na presença de todos os elementos simultaneamente foram feitas soluções sintéticas e as amostras A e C fortificadas, contendo todos os analitos. Para o preparo da solução sintética foi utilizado um meio pobre em nutrientes que continha 40, 500, 40, 500 e 140 mg L⁻¹ de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr. Para o preparo da amostra fortificada, as amostras nomeadas A e C foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado e diluído 10 vezes. As amostras diluídas foram separadas em alíquotas para a fortificação de todos os analito na mesma condição de concentração na solução sintética.

Os ensaios de biorremediação foram feitos aplicando as condições otimizadas nos planejamentos e, foram utilizados *B. subtilis* comercial, A Sb 1 e A Sb 3 para a remoção dos analitos. Após as interações, o sobrenadante foi separado para análise, a biomassa centrifugada foi lavada e após foi decomposta para os cálculos de balanço de massa.

Nas Tabela 25, 26 e 27 são mostrados os valores de remoção para todos os analitos utilizando *B. subtilis* comercial e os micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3, nas soluções sintéticas multielementares. São mostrados também os valores em % dos analitos presentes nas soluções após a etapa de lavagem e a decomposição da biomassa. Os valores em % da remoção e do sobrenadante foram calculados em função da concentração de cada analito, obtida da solução controle, enquanto que os valores em % das etapas de lavagens e de decomposição foram calculados em função da concentração de cada analito no sobrenadante.

Tabela 25. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do *B. subtilis* comercial com os analitos em solução sintética multielementar (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	88,9 \pm 3,7	11,4 \pm 1,2	66,0 \pm 1,54	15,2 \pm 1,2	92,6 \pm 1,7
Ca	0,28 \pm 0,01	99,7 \pm 3,1	2,65 \pm 0,58	0	102 \pm 4
Mg	4,66 \pm 0,64	95,2 \pm 2,7	1,96 \pm 0,04	0	97,2 \pm 2,4
Ba	16,17 \pm 1,7	83,8 \pm 1,9	15,7 \pm 1,0	0	99,5 \pm 1,2
Sr	4,16 \pm 0,44	95,9 \pm 1,8	1,36 \pm 0,89	0	97,3 \pm 2,5

Tabela 26. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 1 com os analitos em solução sintética multielementar (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	80,4 \pm 1,3	19,6 \pm 0,9	57,6 \pm 0,4	25,3 \pm 1,1	103 \pm 3
Ca	6,78 \pm 0,35	93,2 \pm 2,4	13,9 \pm 0,21	0	107 \pm 3
Mg	4,49 \pm 0,98	95,5 \pm 1,9	2,07 \pm 0,34	0	97,6 \pm 1,6
Ba	28,1 \pm 2,3	71,8 \pm 1,8	26,3 \pm 0,4	0	98,2 \pm 2,6
Sr	8,75 \pm 1,07	91,3 \pm 1,8	9,67 \pm 0,75	0	101 \pm 2

Tabela 27. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 3 com os analitos em solução sintética multielementar (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	83,2 \pm 1,3	16,9 \pm 0,4	53,6 \pm 0,9	31,6 \pm 1,8	102 \pm 2
Ca	1,80 \pm 0,23	98,2 \pm 2,1	1,69 \pm 0,17	0	99,9 \pm 2,1
Mg	7,12 \pm 1,42	92,9 \pm 1,1	2,22 \pm 0,23	0	95,1 \pm 3,5
Ba	30,9 \pm 2,1	69,1 \pm 1,9	29,1 \pm 0,7	0	98,2 \pm 3,4
Sr	6,35 \pm 0,45	93,7 \pm 1,8	8,29 \pm 0,73	0	102 \pm 3

Para melhor comparação dos valores de remoção obtidos, na Figura 19 são mostrados os valores de remoção para todos os analitos utilizando *B. subtilis* comercial e os micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3 nas soluções sintéticas multielementares.

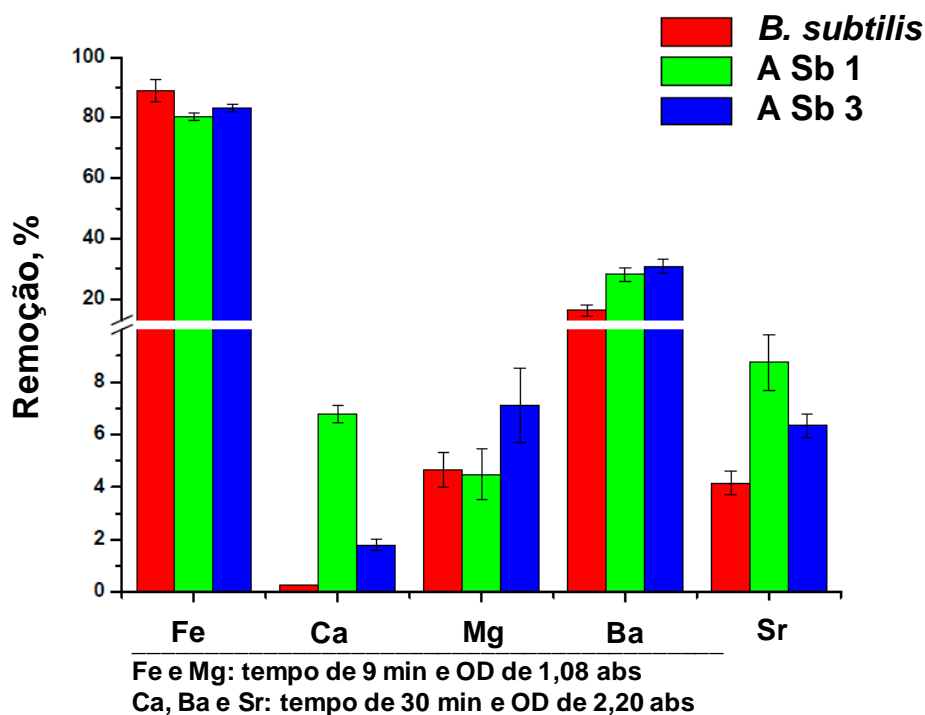


Figura 19. Valores, em %, de remoção após as interações do *B. subtilis* comercial e dos micro-organismos isolados com os analitos em soluções sintéticas multielementares.

Nas Tabela 28, 29 e 30 são mostrados os valores de remoção para todos os analitos utilizando *B. subtilis* comercial e os micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3, na amostra A com fortificação multielementar. São mostrados também os valores em % dos analitos presentes nas soluções após a etapa de lavagem e a decomposição da biomassa. Os valores em % da remoção e do sobrenadante foram calculados em função da concentração de cada analito, obtida da solução controle, enquanto que os valores em % das etapas de lavagens e de decomposição foram calculados em função da concentração de cada analito no sobrenadante.

Tabela 28. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do *B. subtilis* comercial com os analitos na amostra A com fortificação multielementar (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	91,8 \pm 2,0	8,2 \pm 0,3	52,0 \pm 0,4	22,0 \pm 1,1	105 \pm 2
Ca	2,20 \pm 0,12	97,8 \pm 1,7	3,21 \pm 0,12	0	101 \pm 1
Mg	1,68 \pm 0,57	98,4 \pm 2,3	2,56 \pm 0,23	0	101 \pm 2
Ba	28,3 \pm 1,1	71,7 \pm 2,1	26,2 \pm 1,7	0	97,8 \pm 3,5
Sr	2,26 \pm 0,23	97,8 \pm 1,4	1,00 \pm 0,89	0	98,7 \pm 2,2

Tabela 29. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 1 com os analitos na amostra A com fortificação multielementar (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	89,2 \pm 1,9	10,9 \pm 0,8	60,1 \pm 1,2	19,6 \pm 1,4	90,6 \pm 4,2
Ca	0,73 \pm 0,12	99,3 \pm 2,3	2,53 \pm 0,98	0	102 \pm 3
Mg	0,54 \pm 0,33	99,4 \pm 2,2	2,87 \pm 0,65	0	102 \pm 1
Ba	28,1 \pm 1,2	71,9 \pm 15	33,2 \pm 1,3	0	105 \pm 2
Sr	3,09 \pm 0,47	96,9 \pm 1,1	5,11 \pm 0,87	0	102 \pm 1

Tabela 30. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 3 com os analitos na amostra A com fortificação multielementar (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	77,3 \pm 3,2	22,8 \pm 0,2	47,5 \pm 0,2	27,0 \pm 2,1	97,4 \pm 1,6
Ca	0,20 \pm 0,15	99,8 \pm 2,1	3,23 \pm 0,43	0	103 \pm 2
Mg	0,38 \pm 0,12	99,6 \pm 1,1	6,37 \pm 0,12	0	106 \pm 2
Ba	23,2 \pm 0,9	76,8 \pm 1,8	30,1 \pm 0,1	0	107 \pm 3
Sr	4,12 \pm 0,98	95,9 \pm 1,1	1,67 \pm 0,56	0	97,6 \pm 2,1

Para fins de comparação dos valores de remoção obtidos, na Figura 20 são mostrados os valores de remoção para todos os analitos utilizando *B. subtilis* comercial e os micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3 na amostra A com fortificação multielementar.

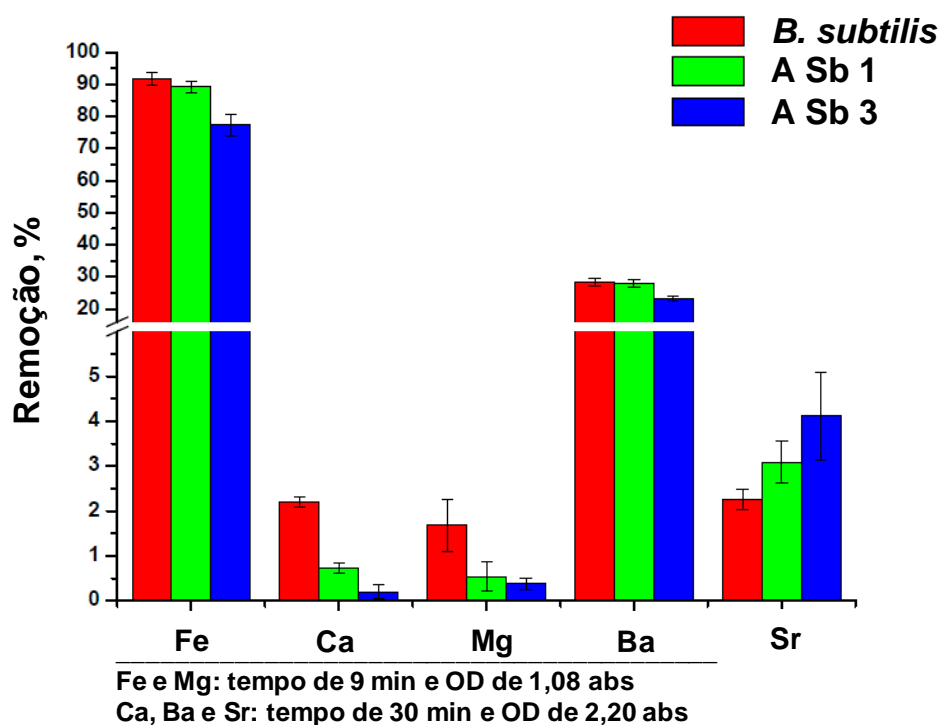


Figura 20. Valores, em %, de remoção após as interações do *B. subtilis* comercial e dos micro-organismos isolados com os analitos na amostra A com fortificação multielementar.

Nas Tabela 31, 32 e 33 são mostrados os valores de remoção para todos os analitos utilizando *B. subtilis* comercial e os micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3, na amostra C com fortificação multielementar. São mostrados também os valores em % dos analitos presentes nas soluções após a etapa de lavagem e a decomposição da biomassa. Os valores em % da remoção e do sobrenadante foram calculados em função da concentração de cada analito, obtida da solução controle, enquanto que os valores em % das etapas de lavagens e de decomposição foram calculados em função da concentração de cada analito no sobrenadante.

Tabela 31. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do *B. subtilis* comercial com os analitos na amostra C com fortificação multielementar (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	81,5 \pm 3,3	18,5 \pm 0,6	46,2 \pm 1,2	35,3 \pm 1,9	100 \pm 4
Ca	1,58 \pm 0,87	98,4 \pm 2,2	9,64 \pm 0,54	0	108 \pm 1
Mg	1,24 \pm 0,24	98,8 \pm 1,3	1,17 \pm 0,23	0	100 \pm 1
Ba	22,2 \pm 1,2	77,8 \pm 1,7	20,0 \pm 1,8	0	97,8 \pm 3,7
Sr	2,45 \pm 0,33	97,6 \pm 1,4	2,03 \pm 0,56	0	99,6 \pm 2,5

Tabela 32. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 1 com os analitos na amostra C com fortificação multielementar (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	73,5 \pm 2,3	26,5 \pm 1,5	40,8 \pm 0,4	28,3 \pm 1,1	95,6 \pm 2,4
Ca	1,98 \pm 0,54	98,0 \pm 1,4	7,03 \pm 0,65	0	105 \pm 2
Mg	1,87 \pm 0,43	98,1 \pm 1,2	2,89 \pm 0,54	0	101 \pm 2
Ba	20,2 \pm 0,42	79,8 \pm 2,2	22,1 \pm 1,4	0	102 \pm 2
Sr	2,23 \pm 0,43	97,8 \pm 1,6	3,26 \pm 0,98	0	101 \pm 3

Tabela 33. Valores, em %, de remoção e balanço de massa após as interações do micro-organismo isolado A Sb 3 com os analitos na amostra C com fortificação multielementar (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analito	Remoção	Sobrenadante	Lavagem	Decomposição	Balanço de massa
Fe	65,5 \pm 1,8	34,5 \pm 1,9	36,5 \pm 0,4	28,5 \pm 2,1	99,5 \pm 2,2
Ca	1,87 \pm 0,34	98,1 \pm 2,3	4,93 \pm 0,15	0	103 \pm 3
Mg	1,56 \pm 0,34	98,4 \pm 1,2	6,7 \pm 0,26	0	105 \pm 5
Ba	19,0 \pm 1,8	81,0 \pm 1,7	22,1 \pm 0,9	0	103 \pm 3
Sr	2,13 \pm 0,46	97,9 \pm 1,1	1,84 \pm 0,86	0	99,7 \pm 2,9

Para a comparação dos valores de remoção obtidos, na Figura 21 são mostrados os valores de remoção para todos os analitos utilizando *B. subtilis* comercial e os

micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3 na amostra C com fortificação multielementar.

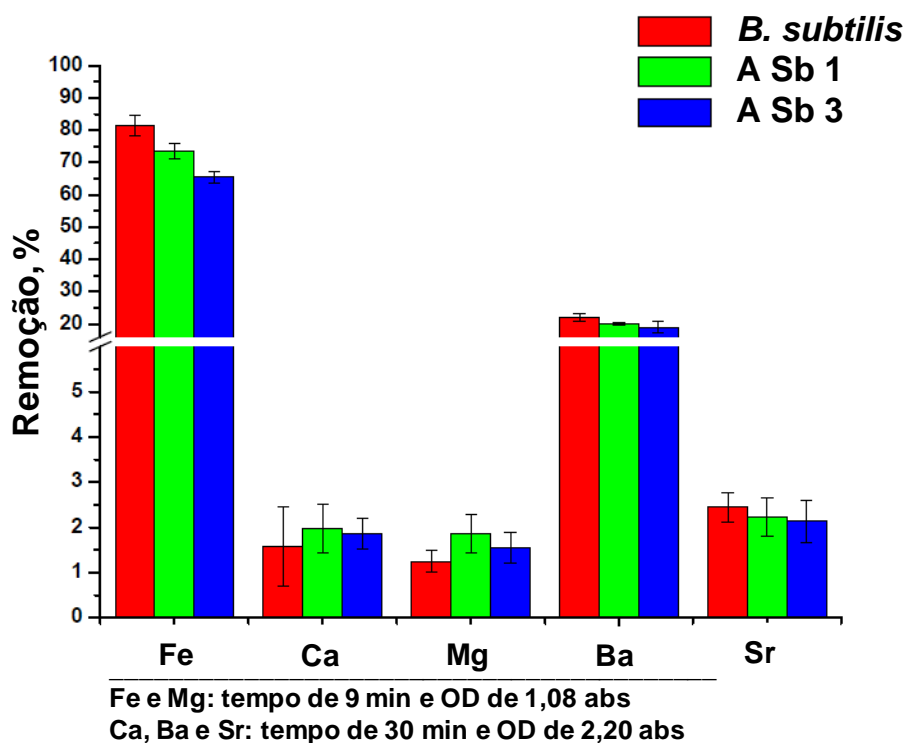


Figura 21. Valores, em %, de remoção após as interações do *B. subtilis* comercial e dos micro-organismos isolados com os analitos na amostra C com fortificação multielementar.

É possível observar pelas Tabela 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33 e pelas Figura 19, 20 e 21 que as remoções para Fe foram satisfatórias, todas acima de 77% para as amostras A, B e D. Para a amostra C, fortificada com todos os analitos, as remoções foram de $73,5 \pm 2,3$ e $65,5 \pm 1,8\%$ utilizando os micro-organismos isolados A Sb 1 e A Sb 3, respectivamente. Em geral, para Fe, houve uma ligeira diminuição do valor de remoção nas soluções multielementares quando comparado com as soluções monoelementares, cujas remoções foram em torno de 90%, principalmente para a amostra C.

Para Ba, tanto na solução sintética como na amostra A nas soluções multielementares, foi possível observar um menor valor de remoção, cerca de 25%, quando comparado com as soluções monoelementares, que foi cerca de 50%. Ainda, para a amostra A foi possível observar uma variação no comportamento dos

micro-organismos isolados na remoção do metal. O micro-organismo *B. subtilis* comercial teve uma remoção inferior (aproximadamente 16%) quando comparado com os micro-organismos isolados (cerca de 29%). Para Ba na amostra C, os valores de remoção encontrados nas soluções multielementares foram similares quando comparados as soluções monoelementares para os três micro-organismos avaliados, em torno de 20% de remoção.

Ressalta-se que a ligeira diminuição na remoção de Ba e Fe observada em amostras de água de produção de petróleo pode ser explicada devido a presença de diversos metais na matriz que competem entre si e dificultam a entrada desses elementos nas células. Além disso, a presença de demais íons divalentes no meio satura os grupamentos aniônicos presentes intra e extracelularmente, causando um impedimento e diminuindo a remoção desses elementos.

Para os demais elementos, Ca, Mg e Sr, remoções inferiores a 10% foram encontradas para todas as soluções e amostras utilizando os três micro-organismos avaliados neste trabalho. Embora, as remoções obtidas para todos os analitos estudados sejam consideradas adequadas para que o processo de biorremediação seja utilizado de forma complementar aos tratamentos convencionais das águas de produção provenientes da extração de petróleo.

B. subtilis comercial e os micro-organismos isolados, A Sb 1 e A Sb 3, também identificados como *B. subtilis*, foram adequados para a remoção dos elementos avaliados o que corrobora com a literatura que destaca a capacidade deste gênero de micro-organismos em adsorver ou absorver metais, inclusive metais tóxicos.^{66,67,85} Em outro trabalho, Arivalagan *et al.*⁶⁶ isolaram um micro-organismo de um solo industrial, o qual foi identificado molecularmente por *B. cereus*. Os autores avaliaram a bioadsorção de Cd pelo micro-organismo isolado e obtiveram remoções de Cd de 82% em pH 6 e temperatura de 35 °C, com concentração inicial de Cd de 200 mg L⁻¹. Os autores concluíram que o *B. cereus* foi adequado para ser usado nos processos de biorremediação para a remoção de Cd em solos industriais poluídos. Cabe destacar que esse micro-organismo é do mesmo gênero que os micro-organismos isolados deste trabalho, entretanto ambos são de espécies diferentes, o que pode levar a características diferentes para cada micro-organismo.

Elementos como Ca, Fe e Mg são considerados essenciais para os micro-organismos, Sr é considerado como não essencial e não tóxico para os micro-organismos, enquanto que Ba não é reportado.⁸⁴ Isso levaria ao pensamento de

obter altas remoções para Ca, Fe e Mg, devido a esses elementos participarem das funções essenciais dos micro-organismos. Entretanto, apenas para Fe foi obtido altas remoções, enquanto que para Ca e Mg foram obtidas remoções baixas, inferiores a 10%. Cabe destacar ainda que são escassos os trabalhos na literatura que exemplificam a absorção ou adsorção desses analitos pelos micro-organismos.

Conclui-se que as remoções obtidas para todos os analitos estudados foram adequadas para que o processo de biorremediação seja utilizado de forma complementar aos tratamentos convencionais das águas de produção provenientes da extração de petróleo. Em especial, de forma complementar aos tratamentos que utilizam colunas de troca-iônica, que possuem alto custo de aquisição devido ao alto valor das resinas de troca-iônica utilizadas e ao elevado custo de manutenção, em vista dessas resinas sofrerem saturação e ter a necessidade de um tratamento químico para retirada desses metais sorvidos. Salienta-se ainda que a utilização de micro-organismos isolados das amostras de águas de produção estudadas neste trabalho é uma alternativa relevante devido esses micro-organismos estarem adaptados as condições de baixa disponibilidade de nutrientes e altas concentrações de metais. Cabe destacar que a eficiência dos processos depende do tipo de amostra (composição química) e dos metais a serem removidos, tendo em vista que baixas eficiências de remoção foram obtidas para alguns metais (Ca, Mg e Sr), enquanto que para outros resultados de remoção superior a 50% foram alcançados.

Com relação aos resíduos, cabe destacar que nos processos de biorremediação há a geração da biomassa bacteriana contendo os metais que foram removidos das amostras. Após as remoções, há a necessidade que este resíduo tenha um destino adequado, de forma a não gerar impacto sobre o meio ambiente. Dessa maneira, entende-se por destinação do resíduo desde o seu descarte até o reaproveitamento do mesmo.

Para o descarte do resíduo de biomassa bacteriana é necessário que este esteja em condições adequadas para o transporte, destinação final e em boas condições sanitárias para que não provoque contaminação do solo ou das águas. Uma opção usada para a diminuição dos riscos de contaminação é a incineração, o que leva a uma diminuição do volume de resíduo além da sua esterilização, sendo que, após a incineração, as cinzas são descartadas em aterros especiais. Dentre as opções de descarte de resíduos encontram-se: o descarte em aterro sanitário e a disposição marítima.

Uma outra alternativa para o resíduo gerado nos processos de biorremediação é o seu aproveitamento na agricultura, onde a resolução do CONAMA nº 375 de 2006, relata a utilização de lodo de esgoto ou produtos derivados na agricultura, monitorando algumas características desse lodo como a concentração de metais.⁸⁶ Além disso, alguns resíduos microbiológicos podem também ser agregados na construção, transformando esses resíduos em matéria prima, porém o material deverá apresentar características que sejam superiores às mínimas exigidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Cabe destacar que caso o resíduo de biomassa do presente trabalho fosse ser reaproveitado na agricultura ou tivesse outra destinação, como em aterros ou marítma, não acarretaria danos significativos ao ambiente tendo em vista que os metais encontrados (e removidos das amostras) não apresentam elevada toxicidade.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, buscou-se desenvolver método analítico adequado para o preparo de amostra de águas de produção de petróleo para posterior determinação de metais e após, efetuar a remoção de alguns metais utilizando processos de biorremediação. Conforme pode ser observado abaixo, esta seção foi subdividida em itens de acordo com os resultados e conclusões obtidas neste trabalho.

Métodos de preparo de amostras para posterior determinação de metais por ICP-OES:

- O método proposto de MW-UV utilizando ácido diluído combinado com H_2O_2 foi adequado para a decomposição das águas de produção obtidas a partir da extração de petróleo com características variáveis para a posterior determinação de Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, V e Zn.
- Uma alta eficiência de decomposição foi obtida utilizando $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 e $0,4 \text{ mL}$ de H_2O_2 e, valores de TOC nas soluções finais para todas as amostras investigadas foram inferiores a $3,6$, $8,5$, $2,7$ e $15,6 \text{ mg L}^{-1}$, para as amostras A, B, C e D, respectivamente.
- Uma concordância melhor que 94% dos resultados foi obtida para a maioria dos analitos após a MW-UV utilizando CRM com matriz semelhante.
- Para fins de comparação, as amostras de águas de produção de petróleo foram submetidas a decomposição por MW-AD, entretanto foram observados resíduos nas soluções finais, evidenciando a não total decomposição das amostras, impossibilitando a posterior determinação de metais.
- Todas as amostras de águas de produção de petróleo avaliadas foram completamente decompostas (TOC em solução foi reduzido em 98, 80, 78 e 48%, para as amostras A, B, C e D, respectivamente, em comparação com o carbono orgânico total presente nas amostras originais) e, a acidez residual nas soluções finais foi inferior a $0,41 \text{ mol L}^{-1}$, tornando possível a posterior determinação de metais.

- O uso de Sc como padrão interno foi adequado para a determinação dos elementos por ICP-OES para todas as amostras de águas de produção provenientes da extração de petróleo.
- Com base em suas vantagens particulares, a MW-UV pode ser usada como um método de tratamento de águas de produção de petróleo para a posterior determinação de metais. Este método minimiza o uso de ácidos concentrados, conseqüentemente reduzindo a geração de resíduos e consumo de reagentes.

Estudos com os micro-organismos:

- Dois micro-organismos presentes naturalmente nas amostras de águas de produção foram isolados, A Sb 1 e A Sb 3, adaptados às condições de baixa disponibilidade de nutrientes e tolerantes a concentrações crescentes de Ba, Ca, Fe e Mg. Também foi possível isolar uma levedura, no entanto, esta não foi investigada neste trabalho.
- Através da construção de uma árvore filogenética, foi possível sugerir que os micro-organismos isolados são pertencentes ao gênero e espécie *B. subtilis*, o que foi concordante com o uso do *B. subtilis* comercial ATCC 6633 usado como referência nos ensaios de biorremediação.
- Os processos de biorremediação em amostras de águas de produção de petróleo foram adequados para a remoção de Ba, Ca, Fe, Mg e Sr, onde foram obtidos altos valores de remoção para Ba e Fe, 50 e 90%, respectivamente, nas soluções sintéticas. Enquanto que para Ca e Mg, foram obtidas remoções inferiores a 10% e para Sr foi obtido cerca de 14% de remoção.
- Há a necessidade de estudos complementares na etapa de lavagem da biomassa bacteriana feita para fins de cálculos de balanço de massa, a fim de verificar a integridade das paredes celulares. Estudos devem ser feitos utilizando MEV para obter imagens mais precisas e garantir, com maior confiabilidade, se o uso de ácido nítrico diluído (2 e 10%) e água morna não rompem as paredes celulares.

- O comportamento dos micro-organismos, tanto *B. subtilis* como os isolados, foi semelhante em função das diferenças características das amostras (teor de carbono orgânico extremamente diferente).
 - No geral, não houve grandes diferenças nos valores de remoção encontrados para Fe e Ba nas soluções multielementares, resultando em adequadas remoções mesmo na presença de todos os analitos.
-
- ✓ As remoções obtidas para todos os analitos estudados, principalmente para Ba e Fe, foram adequadas para que o processo de biorremediação seja utilizado de forma complementar aos tratamentos convencionais das águas de produção provenientes da extração de petróleo.
 - ✓ Além disso, uma grande vantagem é a aplicabilidade do processo de biorremediação utilizando condições similares para todos os elementos.

7 REFERÊNCIAS

1. M.A. Al-Ghouti, M.A. Al-Kaabi, M.Y. Ashfaq, D.A. Da'na. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review, *Journal of Water Process Engineering*, **2019**, 28, 222–239.
2. A. Fakhru'l-Razi, A. Pendashteh, L.C. Abdullah, D.R.A. Biak, S.S. Madaeni, Z.Z. Abidin. Review of technologies for oil and gas produced water treatment, *Journal of Hazardous Materials*, **2009**, 170, 530–551.
3. K. Lee, J. Neff. Produced Water: Environmental Risks and Advances in Mitigation Technologies, in: *Prod. Water*, **2011**.
4. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução 393/07 publicada no DOU nº 153, de 9 de agosto de 2007, Seção 1, páginas 72-73.
5. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução 357/05 publicada no DOU nº 053, de 17 de março de 2005, Seção 1, páginas 58-63.
6. Micheli da Silva Ferreira *et al.* Contaminação por metais traço em mexilhões, *Ciência Rural*, **2013**, 43, 1012–1020.
7. S.K. Gunatilake. Methods of Removing Heavy Metals from Industrial Wastewater, **2015**, 1, 12–18.
8. H.A. Qdais, H. Moussa. Removal of heavy metals from wastewater by membrane processes: A comparative study, *Desalination*, **2004**, 164, 105–110.
9. P. Singh, R. Jain, N. Srivastava, A. Borthakur, D.B. Pal, R. Singh, S. Madhav, P. Srivastava, D. Tiwary, P.K. Mishra. Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: A review, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **2017**, 47, 155–201.
10. G. Grindlay, L. Gras, J. Mora, M.T.C. de Loos-Vollebregt. Carbon-related matrix effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, **2008**, 63, 234–243.

11. S.J. Hill, A. Fisher, M. Foulkes. in *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*, ed. S. J. Hill, A. Fisher and F. Michael, Blackwell Publishing Ltd, 2nd ed., Oxford, **2007**.
12. G. Knapp. Mechanized techniques for sample decomposition and element preconcentration, *Mikrochimica Acta*, **1991**, 104, 445–455.
13. F.J. Krug. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Piracicaba, **2010**.
14. D. Florian, G. Knapp. High-temperature, microwave-assisted UV digestion: A promising sample preparation technique for trace element analysis, *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, 1515–1520.
15. C.A. Hartwig, R.M. Pereira, F.S. Rondan, S.M. Cruz, F.A. Duarte, E.M.M. Flores, M.F. Mesko. The synergic effect of microwave and ultraviolet radiation for chocolate digestion and further determination of As, Cd, Ni and Pb by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2016**, 31, 523–530.
16. A. Limbeck. Microwave-assisted UV-digestion procedure for the accurate determination of Pd in natural waters, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 575, 114–119.
17. M.F. Mesko, R.S. Picoloto, L.R. Ferreira, V.C. Costa, C.M.P. Pereira, P. Colepicolo, E.I. Muller, E.M.M. Flores. Ultraviolet radiation combined with microwave-assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further determination of toxic elements by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2015**, 30, 260–266.
18. J.S.S. Oliveira, R.S. Picoloto, C.A. Bizzi, P.A. Mello, J.S. Barin, E.M.M. Flores. Microwave-assisted ultraviolet digestion of petroleum coke for the simultaneous determination of nickel, vanadium and sulfur by ICP-OES, *Talanta*, **2015**, 144, 1052–1058.

19. J.S.F. Pereira, R.S. Picoloto, L.S.F. Pereira, R.C.L. Guimarães, R.A. Guarnieri, E.M.M. Flores. High-efficiency microwave-assisted digestion combined to in situ ultraviolet radiation for the determination of rare earth elements by ultrasonic nebulization ICPMS in crude oils, *Analytical Chemistry*, **2013**, 85, 11034–11040.
20. J.S.F. Pereira, H. Wiltsche, G. Knapp. Microwave-Assisted Ultraviolet Digestion, In: Microwave-assisted sample preparation for Trace Element Determination, É. M. M. Flores, Elsevier, Amsterdam, **2014**.
21. C.A. Hartwig, R.M. Pereira, D.L.R. Novo, D.T.T. Oliveira, M.F. Mesko. Green and efficient sample preparation method for the determination of catalyst residues in margarine by ICP-MS, *Talanta*, **2017**, 174, 394–400.
22. P.S. Barela, J.P. Souza, J.S.F. Pereira, J.C. Marques, E.I. Müller, D.P. Moraes. Development of a microwave-assisted ultraviolet digestion method for biodiesel and subsequent trace elements determination by SF-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2018**, 33, 1049–1056.
23. K.S.L. De Figueredo, C.A. Martínez-Huitle, A.B.R. Teixeira, A.L.S. de Pinho, C.A. Vivacqua, D.R. da Silva. Study of produced water using hydrochemistry and multivariate statistics in different production zones of mature fields in the Potiguar Basin - Brazil, *Journal of Petroleum Science and Engineering*, **2014**, 116, 109–114.
24. F.J. Holler, D.A. Skoog, S.R. Crouch. *Princípios de Análise Instrumental*, Bookman, **2009**.
25. E. De Oliveira. Sample preparation for atomic spectroscopy: Evolution and future trends, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2003**, 14, 174–182.
26. M.A.Z. Arruda, R.E. Santelli. *Mecanização do preparo de amostras por micro-ondas - 1997*.
27. E.P. Oliveira, R.E. Santelli, R.J. Cassella. Combined use of Pd and HF as chemical modifiers for the determination of total chromium in produced waters from petroleum exploration by ET AAS, *Microchemical Journal*, **2008**, 89, 116–122.

28. E.P. Oliveira, R.E. Santelli, R.J. Cassella. Direct determination of lead in produced waters from petroleum exploration by electrothermal atomic absorption spectrometry X-ray fluorescence using Ir-W permanent modifier combined with hydrofluoric acid, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 545, 85–91.
29. R.J. Cassella, E.P. Oliveira, O.I.B. Magalhães. Direct determination of vanadium in high saline produced waters from offshore petroleum exploration by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta*, **2006**, 69, 48–54.
30. S.G. Udeagbara, S.O. Ogiriki, F. Afolabi, O. Fakorede. Quantitative analysis of heavy metals in produced water from NDX 011 in Niger-Delta oil field, *International Journal of Petroleum and Gas Engineering Research*, **2019**, 3, 19–33.
31. M. Hardi, Y.I. Siregar, S. Anita, M. Ilza. Determination of heavy metals concentration in produced water of oil field exploration in siak regency, *Journal of Physics: Conference Series*, **2019**, 1156, 012009.
32. I. Sánchez Trujillo, E. Vereda Alonso, A. García de Torres, J.M. Cano Pavón. Development of a solid phase extraction method for the multielement determination of trace metals in natural waters including sea-water by FI-ICP-MS, *Microchemical Journal*, **2012**, 101, 87–94.
33. G. Cheng, M. He, H. Peng, B. Hu. Dithizone modified magnetic nanoparticles for fast and selective solid phase extraction of trace elements in environmental and biological samples prior to their determination by ICP-OES, *Talanta*, **2012**, 88, 507–515.
34. M. Jamshidi, M. Ghaedi, K. Mortazavi, M.N. Biareh, M. Soyak. Determination of some metal ions by flame-AAS after their preconcentration using sodium dodecyl sulfate coated alumina modified with 2-hydroxy-(3-((1-H-indol 3-yle)phenyl) methyl) 1-H-indol (2-HIYPMI), *Food and Chemical Toxicology*, **2011**, 49, 1229–1234.

35. A.P.S. Gonzáles, M.A. Firmino, C.S. Nomura, F.R.P. Rocha, P. V. Oliveira, I. Gaubeur. Peat as a natural solid-phase for copper preconcentration and determination in a multicommuted flow system coupled to flame atomic absorption spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 636, 198–204.
36. S. Samadi, H. Sereshti, Y. Assadi. Ultra-preconcentration and determination of thirteen organophosphorus pesticides in water samples using solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography with flame photometric detection, *Journal of Chromatography A*, **2012**, 1219, 61–65.
37. C. Duran, D. Ozdes, D. Sahin, V.N. Bulut, A. Gundogdu, M. Soylok. Preconcentration of Cd(II) and Cu(II) ions by coprecipitation without any carrier element in some food and water samples, *Microchemical Journal*, **2011**, 98, 317–322.
38. M. Chamsaz, A. Atarodi, M. Eftekhari, S. Asadpour, M. Adibi. Vortex-assisted ionic liquid microextraction coupled to flame atomic absorption spectrometry for determination of trace levels of cadmium in real samples, *Journal of Advanced Research*, **2013**, 4, 35–41.
39. S.Z. Mohammadi, H. Hamidian, L. Karimzadeh, Z. Moeinadini. Tween 80 coated alumina: An alternative support for solid phase extraction of copper, nickel, cobalt and cadmium prior to flame atomic absorption spectrometric determination, *Arabian Journal of Chemistry*, **2016**, 9, S1290–S1296.
40. I. López-García, M.J. Muñoz-Sandoval, M. Hernández-Córdoba. Cloud point microextraction involving graphene oxide for the speciation of very low amounts of chromium in waters, *Talanta*, **2017**, 172, 8–14.
41. H.S. Dórea, J.R.L. Bispo, K.A.S. Aragão, B.B. Cunha, S. Navickiene, J.P.H. Alves, L.P.C. Romão, C.A.B. Garcia. Analysis of BTEX, PAHs and metals in the oilfield produced water in the State of Sergipe, Brazil, *Microchemical Journal*, **2007**, 85, 234–238.

42. E.W. Rice. Standard methods for the examination of water and wastewater, APHA (American Public Health Association), 22nd ed., Washington, USA, **2012**.
43. F. Shah, T.G. Kazi, H.I. Afridi, Naeemullah, M.B. Arain, J.A. Baig. Cloud point extraction for determination of lead in blood samples of children, using different ligands prior to analysis by flame atomic absorption spectrometry: A multivariate study, *Journal of Hazardous Materials*, **2011**, 192, 1132–1139.
44. J.L. Manzoori, G. Karim-Nezhad. Development of a cloud point extraction and preconcentration method for Cd and Ni prior to flame atomic absorption spectrometric determination, *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 521, 173–177.
45. B. Mohammad, A.M. Ure, D. Littlejohn. On-line preconcentration of aluminium, gallium and indium with quinolin-8-ol for determination by atomic absorption spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1993**, 8, 325–331.
46. M.A. Bezerra, S. Mitihiro do Nascimento Maêda, E.P. Oliveira, M. de Fátima Batista de Carvalho, R.E. Santelli. Internal standardization for the determination of cadmium, cobalt, chromium and manganese in saline produced water from petroleum industry by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after cloud point extraction, *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, **2007**, 62, 985–991.
47. M.A.Z. Arruda. Trends in Sample Preparation, Nova Science Publishers, New York, **2006**.
48. T.R. Penha, J.R. Almeida, R.M. Sousa, E.V.R. De Castro, M.T.W.D. Carneiro, G.P. Brandão. Multielement analysis of crude oil produced water by ICP-OES after acid digestion assisted by microwave, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2015**, 30, 1154–1160.
49. B. Welz, M. Sperling. Atomic Absorption Spectrometry, Wiley-VCH, **2008**.
50. J. Nölte. ICP Emission Spectrometry: A Practical Guide, Wiley, **2003**.
51. A. Montaser, D.W. Golightly. Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry, **1987**.

52. H. Wiltsche, M. Winkler, P. Tirk. Matrix effects of carbon and bromine in inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2015**, 30, 2223–2234.
53. G. Dias, M. Hipólito, F. Santos, R. Lourega, J. de Mattia, P. Eichler, J. Alves. Bioremediation of effluents through the application of microalgae - A review, *Quimica Nova*, **2019**, 42, 891–899.
54. H. Moriwaki, R. Koide, R. Yoshikawa, Y. Warabino, H. Yamamoto. Adsorption of rare earth ions onto the cell walls of wild-type and lipoteichoic acid-defective strains of *Bacillus subtilis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2013**, 97, 3721–3728.
55. H. Moriwaki, H. Yamamoto. Interactions of microorganisms with rare earth ions and their utilization for separation and environmental technology, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2013**, 97, 1–8.
56. H.H. Tuson, D.B. Weibel. Bacteria-surface interactions, *Soft matter*, **2013**.
57. F.L.S. de Alencar, J.A. Navoni, V.S. do Amaral. The use of bacterial bioremediation of metals in aquatic environments in the twenty-first century: a systematic review, *Environmental Science and Pollution Research*, **2017**, 24, 16545–16559.
58. S. Taylor. Metal Fluxes Across the Membranes of Aquatic Organisms, *Aquatic Sciences*, **1989**.
59. A. Hassen, N. Saidi, M. Cherif, A. Boudabous. Resistance of environmental bacteria to heavy metals, *Bioresource Technology*, **1998**, 64, 7–15.
60. T. Matsunaga, H. Takeyama, T. Nakao, A. Yamazawa. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater, *Journal Biotechnology*, **1999**, 33–38.
61. C. Dal Magro, M.C. Deon, A. Thomé, J.S. Piccin, L.M. Colla. Biossorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*, *Quimica Nova*, **2013**, 36, 1139–1145.

62. A. Dadrasnia, K.S.C. Wei, N. Shahsavari, M.S. Azirun, S. Ismail. Biosorption potential of *Bacillus salmalaya* strain 139SI for removal of Cr(VI) from aqueous solution, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **2015**, 12, 15321–15338.
63. M.D. Mullen, D.C. Wolf, F.G. Ferris, T.J. Beveridge, C.A. Flemming, G.W. Bailey. Bacterial sorption of heavy metals, *Applied and Environmental Microbiology*, **1989**, 55, 3143–3149.
64. K. Yin, Q. Wang, M. Lv, L. Chen. Microorganism remediation strategies towards heavy metals, *Chemical Engineering Journal*, **2019**, 360, 1553–1563.
65. A. Desaunay, J.M.F. Martins. Comparison of chemical washing and physical cell-disruption approaches to assess the surface adsorption and internalization of cadmium by *Cupriavidus metallidurans* CH34, *Journal of Hazardous Materials*, **2014**, 273, 231–238.
66. P. Arivalagan, D. Singaraj, V. Haridass, T. Kaliannan. Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*, *Ecological Engineering*, **2014**, 71, 728–735.
67. S. Ozdemir, M.K. Oduncu, E. Kilinc, M. Soylak. Resistance, bioaccumulation and solid phase extraction of uranium (VI) by *Bacillus vallismortis* and its UV–vis spectrophotometric determination, *Journal of Environmental Radioactivity*, **2017**, 171, 217–225.
68. A. Al-Gheethi, R. Mohamed, E. Noman, N. Ismail, O.A. Kadir. Removal of Heavy Metal Ions From Aqueous Solutions Using *Bacillus subtilis* Biomass Pre-Treated by Supercritical Carbon Dioxide, *Clean - Soil, Air, Water*, **2017**, 45.
69. S. O'Brien, A. Buckling. The sociality of bioremediation: Hijacking the social lives of microbial populations to clean up heavy metal contamination, *EMBO Reports*, **2015**, 16, 1241–1245.
70. M.R. Green, J. Sambrook. *Molecular cloning*, 4th ed., Cold Spring Harbor, New York, **2012**.

71. R.C. Togawa, M.M. Brigido, C.M.R. Santos, M.T. Junior. The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in *Musa acuminata*, XXXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Aguas de Lindoia, SP, Brasil, **2006**.
72. E.Y. Chen, D.M. Langenau. *Manual of Environmental Microbiology, Methods Cell Biol.*, **2011**.
73. IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology, (the “Gold Book”)*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1997**.
74. M. Ghosh, J. Shen, B.P. Rosen, H.R. Kaback. Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae* (ACR3YCF1Sb(III)resistanceABC transporters), *Cell Biology*, **1999**, 96, 5001–5006.
75. E. Maciaszczyk-Dziubinska, D. Wawrzycka, R. Wysocki. Arsenic and antimony transporters in eukaryotes, *International Journal of Molecular Sciences*, **2012**, 13, 3527–3548.
76. J.S. Ki, W. Zhang, P.Y. Qian. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification, *Journal of Microbiological Methods*, **2009**, 77, 48–57.
77. C.A.C. Miranda, O.B. Martins, M.M. Clementino. Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, **2008**, 93, 297–304.
78. R. Starke, N. Jehmlich, T. Alfaro, A. Dohnalkova, P. Capek, S.L. Bell, K.S. Hofmockel. Incomplete cell disruption of resistant microbes, *Scientific Reports*, **2019**, 9, 1–5.
79. J. Geciova, D. Bury, P. Jelen. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - A review, *International Dairy Journal*, **2002**, 12, 541–553.

80. F. Li, D.W. Armstrong, R.S. Houk. Behavior of bacteria in the inductively coupled plasma: Atomization and production of atomic ions for mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **2005**, 77, 1407–1413.
81. M.S. Islam, A. Aryasomayajula, P.R. Selvaganapathy. A review on macroscale and microscale cell lysis methods, *Micromachines*, **2017**, 8.
82. R. Álvarez-Fernández García, M. Corte-Rodríguez, M. Macke, K.L. Leblanc, Z. Mester, M. Montes-Bayón, J. Bettmer. Addressing the presence of biogenic selenium nanoparticles in yeast cells: Analytical strategies based on ICP-TQ-MS, *Analyst*, **2020**, 145, 1457–1465.
83. K. Shigeta, G. Koellensperger, E. Rampler, H. Traub, L. Rottmann, U. Panne, A. Okino, N. Jakubowski. Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2013**, 28, 637–645.
84. R.M. Maier, I.L. Pepper, C.P. Gerba. *Environmental Microbiology*, Academic Press, San Diego, **2009**.
85. M. Oves, M.S. Khan, A. Zaidi. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil, *Saudi Journal of Biological Sciences*, **2013**, 20, 121–129.
86. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução 375/06 publicada no DOU nº 167, de 29 de agosto de 2006, Seção 1, páginas 141-146, **2006**.