

Dissertação de Mestrado

Análise da biorremediação de compostos monoaromáticos em água através da *Pseudomonas aeruginosa*

Jéssica Maria Damião de Arruda Câmara

Natal, Janeiro de 2016

Jéssica Maria Damião de Arruda Câmara

Análise da biorremediação de compostos
monoaromáticos em água através da *Pseudomonas*
aeruginosa

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química – PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Lins de Barros Neto.

Natal/RN
Janeiro/2016

Catálogo da Publicação na Fonte.
UFRN / CT / DEQ
Biblioteca Setorial "Professor Horácio Nicolás Sólino".

Câmara, Jéssica Maria Damião de Arruda.

Análise da biorremediação de compostos monoaromáticos em água através da *pseudomonas aeruginosa*/ Jéssica Maria Damião de Arruda Câmara. - Natal, 2016.

113 f.: il.

Orientador: Eduardo Lins de Barros Neto.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

1. Indústria petrolífera - Dissertação. 2. Água produzida - Dissertação. 3. Hidrocarbonetos - Dissertação. 4. Biodegradação - Dissertação. 5. *Pseudomonas aeruginosa* - Dissertação. I. Barros Neto, Eduardo Lins de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSEO

CDU

CÂMARA, Jéssica Maria Damião de Arruda – Análise da biorremediação de compostos monoaromáticos em água através da *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Engenharia Química. Linha de pesquisa: Engenharia ambiental, Natal-RN, Brasil.

Orientador: Eduardo Lins de Barros Neto

RESUMO: Os compostos monoaromáticos são substâncias tóxicas presentes em derivados de petróleo e usados em larga escala nas indústrias química e petroquímica. Estes compostos são continuamente liberados no meio ambiente, contaminando o solo e as águas, podendo inviabilizar a exploração desses recursos hídricos, devido a sua alta potencialidade carcinogênica e mutagênica, visto que mesmo em baixas concentrações, os BTEX provocam sérios problemas para a saúde humana. Portanto, é de fundamental importância o desenvolvimento e a busca de novas metodologias que possibilitem o tratamento de matrizes contaminadas por esses poluentes. A biorremediação consiste na utilização de grupos microbianos capazes de degradar hidrocarbonetos, promovendo a mineralização, ou seja, a destruição permanente dos resíduos e eliminando os riscos de futuras contaminações. Este trabalho investigou a cinética de biodegradação de compostos monoaromáticos solúveis em água (benzeno, tolueno e etilbenzeno), a partir da avaliação do seu consumo pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, para as concentrações variando de 40 a 200 mg/L. Para tanto, o desempenho do modelo cinético de Monod para crescimento microbiano foram avaliados e as equações de balanço de material em operação batelada foram discretizados e equacionados numericamente pelo método de Runge-Kutta de quarta ordem. Os parâmetros cinéticos, obtidos utilizando a função dos mínimos quadrados como critério estatístico se mostraram coerentes com o observado na literatura, além de evidenciar que, a bactéria tem maior afinidade para a degradação do etilbenzeno. Desta forma, foi possível observar que o modelo de Monod consegue prever os dados experimentais para a biodegradação individual dos substratos BTEX, mostrando que o modelo pode ser aplicado na otimização dos processos de biodegradação de compostos tóxicos em diferentes tipos de biorreatores e condições operacionais.

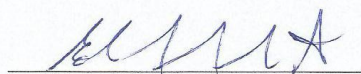
Palavras-chave: Biorremediação. *Pseudomonas aeruginosa*. Compostos monoaromáticos. Runge-Kutta.

Jéssica Maria Damião de Arruda Câmara

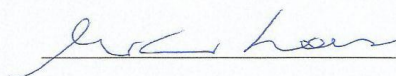
**Análise da biorremediação de compostos monoaromáticos em
água através da *Pseudomona aeruginosa***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química – PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Lins de Barros Neto.

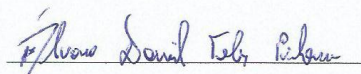
Aprovado (a) em 29/01/2016



Prof. Dr. Eduardo Lins de Barros Neto
Orientador – UFRN



Prof.ª Dr.ª Magna Angélica dos Santos
Bezerra Sousa
Membro Interno – UFRN



Prof. Dr. Álvaro Daniel Teles Pinheiro
Membro Externo - UFRSA

ABSTRACT

The monoaromatic compounds are toxic substances present in petroleum derivatives and used broadly in the chemical and petrochemical industries. Those compounds are continuously released into the environment, contaminating the soil and water sources, leading to the possible unfeasibility of those hydrous resources due to their highly carcinogenic and mutagenic potentiality, since even in low concentrations, the BTEX may cause serious health issues. Therefore, it is extremely important to develop and search for new methodologies that assist and enable the treatment of BTEX-contaminated matrix. The bioremediation consists on the utilization of microbial groups capable of degrading hydrocarbons, promoting mineralization, or in other words, the permanent destruction of residues, eliminating the risks of future contaminations. This work investigated the biodegradation kinetics of water-soluble monoaromatic compounds (benzene, toluene and ethylbenzene), based on the evaluation of its consumption by the *Pseudomonas aeruginosa* bacteria, for concentrations varying from 40 to 200 mg/L. To do so, the performances of Monod kinetic model for microbial growth were evaluated and the material balance equations for a batch operation were discretized and numerically solved by the fourth order Runge-Kutta method. The kinetic parameters obtained using the method of least squares as statistical criteria were coherent when compared to those obtained from the literature. They also showed that, the microorganism has greater affinity for ethylbenzene. That way, it was possible to observe that Monod model can predict the experimental data for the individual biodegradation of the BTEX substrates and it can be applied to the optimization of the biodegradation processes of toxic compounds for different types of bioreactors and for different operational conditions.

Key-words: Bioremediation. *Pseudomonas aeruginosa*. Monoaromatic compounds. Runge-Kutta.

Dedico este trabalho à minha família pelo
apoio e compreensão durante toda essa
jornada.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me dado saúde, benção e luz para chegar ao final dessa etapa tão difícil e cheia de obstáculos.

Um agradecimento especial à minha família, que sempre me amou e nunca duvidou da minha capacidade, mesmo quando eu não achava que seria possível. Para a minha mãe, minha, MAGALÍ NEUMA DAMIÃO DE ARRUDA CÂMARA, que sempre me apoiou e incentivou a fazer as minhas próprias escolhas, além de sempre pedir em suas orações que tudo ocorresse como o planejado nesses experimentos; ao meu pai, SAULO DE ARRUDA CÂMARA, pelo exemplo de caráter que sempre terei como referência para o resto da vida; aos meus irmãos DANIELLE DAMIÃO DE ARRUDA CÂMARA, que sempre me apoiou e ajudou dentro das suas possibilidades, e BRUNO DAMIÃO DE ARRUDA CÂMARA, que mesmo distante tenho a certeza que sempre estava torcendo por mim.

Aos meus amigos que ao longo de toda essa jornada foram meus companheiros para todas as horas e um apoio, me mantendo firme e acreditando na minha capacidade, além de apoiarem as minhas escolhas.

Aos meus professores pelo conhecimento transmitido, em especial ao meu orientador Eduardo Lins de Barros Neto, por ter acreditado no meu trabalho e me transmitir tantos conhecimentos valiosos; à Prof. Dra. Magna Angélica dos Santos Bezerra Sousa, pela paciência e pela ajuda e apoio oferecido por todo esse caminho. E aos demais professores, que mesmo não sendo citados, tiveram uma parcela importantíssima na minha formação.

À Petrobrás, à Agência Nacional de Petróleo e ao CNPQ pela concessão da bolsa e pelos recursos investidos nesse projeto, permitindo que este fosse realizado da melhor forma possível.

Meu muito obrigado a todos que fazem parte da minha vida e que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização dessa etapa.

“Quanto maior a dificuldade, maior a glória em superá-la. Os grandes navegadores devem sua reputação aos temporais e tempestades.”

Epicuro

Lista de figuras

Figura 1: Esquema de um reservatório de óleo.	19
Figura 2: Fórmula estrutural dos aromáticos do grupo BTEX.	20
Figura 3: Fórmula estrutural do benzeno.	24
Figura 4: Fórmula estrutural do tolueno.	25
Figura 5: Fórmula estrutural do xileno.	25
Figura 6: Fórmula estrutural do etilbenzeno.	26
Figura 7: Modelo do sistema de Air Stripping.	29
Figura 8: Modelo do sistema de Air Sparging.	30
Figura 9: Esquema ilustrativo das forças intermoleculares.	42
Figura 10: Ilustração de um monômero de tensoativo.	43
Figura 11: Estrutura dos ramnolipídeos 1-4	47
Figura 12: Fluxograma experimental.	51
Figura 13: Solo contaminado para o desenvolvimento das bactérias.	52
Figura 14: Mecanismo para transferência das bactérias da areia para água.	53
Figura 15: <i>Pseudomonas aeruginosas</i> preservadas em skin milk.	54
Figura 16: Solução de peptona após 10 horas de incubação.	55
Figura 17: Testes de biodegradação.	56
Figura 18: Curva de calibração da Ramnose.	58
Figura 19: Quantificação das bactérias em solo.	62
Figura 20: Consumo de substrato em relação ao tempo.	63
Figura 21: Crescimento da biomassa em relação ao tempo.	64
Figura 22: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o consumo de tolueno.	65
Figura 23: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o crescimento da biomassa.	65
Figura 24: Consumo de substrato em relação ao tempo.	69
Figura 25: Crescimento da biomassa em relação ao tempo.	70
Figura 26: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o consumo do etilbenzeno.	71
Figura 27: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o crescimento da biomassa.	72
Figura 28: Consumo de substrato em relação ao tempo.	75

Figura 29: Crescimento da biomassa em relação ao tempo.....	75
Figura 30: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o consumo do benzeno.....	76
Figura 31: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o crescimento da biomassa.	77
Figura 32: Dados experimentais do consumo de substrato para 80 mg/L.....	80
Figura 33: Dados experimentais do crescimento da biomassa para 80 mg/L.	80

Lista de tabelas

Tabela 1: Análise elementar do petróleo.	16
Tabela 2: Tecnologia de remediação de áreas contaminadas.	28
Tabela 3: Tipos e estratégias de biorremediação.	34
Tabela 4: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.	45
Tabela 5: Composição do meio mineral.	56
Tabela 6: Parâmetros cinéticos para o modelo de Monod.	65
Tabela 7: ANOVA para os dados do tolueno.	67
Tabela 8: Valores de $Y_{P/X}$ para o tolueno.	68
Tabela 9: Valores de $Y_{P/S}$ para o tolueno.	69
Tabela 10: Parâmetros cinéticos para o modelo de Monod.	71
Tabela 11: ANOVA para os dados do etilbenzeno.	73
Tabela 12: Valores de $Y_{P/X}$ para o etilbenzeno.	74
Tabela 13: Valores de $Y_{P/S}$ para o etilbenzeno.	74
Tabela 14: Parâmetros cinéticos para o modelo de Monod.	76
Tabela 15: ANOVA para os dados do benzeno.	78
Tabela 16: Valores de $Y_{P/X}$ para o benzeno.	79
Tabela 17: Valores de $Y_{P/S}$ para o benzeno.	79
Tabela 18: Parâmetros cinéticos.	81
Tabela 19: Dados experimentais para concentração inicial de 50 mg/L de tolueno.	106
Tabela 20: Dados experimentais para concentração inicial de 80 mg/L de tolueno.	106
Tabela 21: Dados experimentais para concentração inicial de 100 mg/L de tolueno.	107
Tabela 22: Dados experimentais para concentração inicial de 120 mg/L de tolueno.	107
Tabela 23: Dados experimentais para concentração inicial de 170 mg/L de tolueno.	108
Tabela 24: Dados experimentais para concentração inicial de 40 mg/L de etilbenzeno.	108
Tabela 25: Dados experimentais para concentração inicial de 60 mg/L de etilbenzeno.	109
Tabela 26: Dados experimentais para concentração inicial de 80 mg/L de etilbenzeno.	109
Tabela 27: Dados experimentais para concentração inicial de 120 mg/L de etilbenzeno.	110
Tabela 28: Dados experimentais para concentração inicial de 150 mg/L de etilbenzeno.	110
Tabela 29: Dados experimentais para concentração inicial de 50 mg/L de benzeno.	111
Tabela 30: Dados experimentais para concentração inicial de 80 mg/L de benzeno.	111
Tabela 31: Dados experimentais para concentração inicial de 120 mg/L de benzeno.	112
Tabela 32: Dados experimentais para concentração inicial de 160 mg/L de benzeno.	112

Tabela 33: Dados experimentais para concentração inicial de 200 mg/L de benzeno..... 113

Nomenclatura

BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
HPAs - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
TOG – Total de Óleos e Graxas
TOC – Carbono Orgânico Total
CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente
DQO – Demanda Química de Oxigênio
Ppb – Partes por bilhão
IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
COV – Compostos Orgânicos Voláteis
POA - Processos Oxidativos Avançados
CO₂ – Dióxido de carbono
NAPL - *non-aqueous phase liquid*
DNAPL - *dense non-aqueous phase liquid*
PCBs - bifenilas policloradas
rpm – Rotação por minuto

Símbolos e unidades

$\mu_{\text{máx}}$ – taxa de crescimento específico máxima, h⁻¹
K_s – Constante de saturação, mg/L
Y_{X/S} – razão entre biomassa e substrato, mg/mg
Y_{P/X} – razão entre produto e biomassa, mg/mg
Y_{P/S} – razão entre produto e substrato, mg/mg
K_I – Constante de inibição, mg/L
X – Concentração de biomassa, mg/L
S – Concentração de substrato, mg/L
P – Concentração de produto, mg/L

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Petróleo e seus derivados	16
2.2 Água produzida.....	17
2.3 Impactos ambientais	20
2.4 Gerenciamento e tratamento da água produzida.....	21
2.5 Hidrocarbonetos monoaromáticos	22
2.5.1 Benzeno.....	23
2.5.2 Tolueno.....	24
2.5.3 Xileno.....	25
2.5.4 Etilbenzeno.....	26
2.6 Processos de remoção e tratamento de compostos monoaromáticos.....	27
2.6.1 Processos não biológicos.....	28
2.6.1.1 Air stripping	28
2.6.1.2 Air sparging.....	29
2.6.1.3 Contenção hidráulica.....	30
2.6.1.4 Processos oxidativos avançados (POA).....	31
2.6.2 Processos biológicos	31
2.6.2.1 Biorremediação	32
2.6.2.1.1 Atenuação natural.....	34
2.6.2.1.2 Bioestimulação	36
2.6.2.1.3 Bioventilação.....	37
2.6.2.1.4 Bioaugmentação	37
2.7 Derramamento de derivados do petróleo na água.....	38
2.8 Dinâmica dos compostos do óleo bruto	40
2.9 Tensão superficial	41
2.10 Surfactantes.....	42
2.11 Biossurfactante.....	43
2.12 Principais biossurfactantes e microrganismos produtores	44
2.13 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
2.14 Ramnolipídeos	46

2.15 Modelos cinéticos de crescimento microbiano	47
2.15.1 Modelo de Monod	48
2.15.2 Modelo de Andrews	49
3 METODOLOGIA.....	51
3.1 Desenvolvimento das bactérias em solo	52
3.2 Análise do solo para identificação e quantificação das bactérias	53
3.3 Preservação das bactérias.....	54
3.4 Desenvolvimento das bactérias preservadas	54
3.5 Ensaio de biodegradação de compostos monoaromáticos	55
3.6 Determinações analíticas	57
3.6.1 Determinação da concentração celular.....	57
3.6.2 Determinação da concentração de biossurfactante.....	57
3.6.3 Determinação da concentração de monoaromáticos	59
3.7 Procedimento para a identificação dos parâmetros cinéticos	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
4.1 Resultado do desenvolvimento das bactérias em solo	62
4.2 Teste de biorremediação para compostos monoaromáticos.....	63
4.2.1 Tolueno.....	63
4.2.2 Etilbenzeno.....	69
4.2.3 Benzeno	74
4.3 Avaliação da cinética para os compostos monoaromáticos.....	79
5 CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Grandes quantidades de substâncias orgânicas e inorgânicas são continuamente liberadas no meio ambiente, principalmente como resultado das inúmeras atividades humanas (SABATÉ *et al.*, 2004). As indústrias petroquímicas são uma das principais responsáveis pela geração de grandes quantidades de efluentes líquidos, os quais são formados durante as etapas de produção, transporte e refino. Esses efluentes, muitas vezes, apresentam um elevado potencial de toxicidade. Portanto, reduzir e controlar a poluição têm sido um desafio para a indústria, especialmente porque o impacto ambiental e os acidentes ecológicos são dois fatores ainda não totalmente dominados (MELLO, 2007).

A água produzida é a maior fonte de poluição relacionada às atividades petrolíferas, pois contém muitos contaminantes, incluindo hidrocarbonetos, metais pesados e aditivos químicos (ANDRADE *et al.*, 2009, LAWRENCE *et al.*, 1995; STEPHENSON, 1992). Dentre as espécies mais solúveis e tóxicas presentes na água produzida, destacam-se os compostos aromáticos, tais como o benzeno, o tolueno, etilbenzeno, isômeros de xileno, fenóis, etc.

Os compostos BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno) possuem como característica principal a presença do anel benzênico em sua estrutura, o que os torna bastante estáveis, dificultando a sua remoção do meio ambiente (JO *et al.*, 2008; YANG; JIANG; SHI, 2006). Estes componentes, mesmo em baixas concentrações, podem trazer sérios danos ao meio ambiente e à saúde humana, causando desde danos ao sistema nervoso central até ao desenvolvimento de câncer.

Embora a legislação imposta por órgãos ambientais nacionais e internacionais venha se tornando cada vez mais restritiva, episódios de contaminação envolvendo petróleo e derivados continuam bastante frequentes, o que coloca em risco a qualidade de solos, águas superficiais e subterrâneas e, conseqüentemente, a saúde da população.

Portanto, a busca de novas tecnologias para tratamento de matrizes contaminadas por poluentes orgânicos deste tipo é bastante relevante. Porém, normalmente, os tratamentos físico-químicos convencionais utilizados para a remoção de BTEX do meio ambiente, além de demandarem elevados custos operacionais, não destroem os contaminantes, apenas os transportam de fase. Nesse sentido, os processos

biológicos são considerados como uma tecnologia eficiente na remoção de BTEX de águas contaminadas e efluentes, especialmente por causa da sua simplicidade operacional e baixo custo quando comparado a outros métodos (BERTIN *et al.*, 2007; MASSALHA *et al.*, 2007; MAZZEO *et al.*, 2010).

Assim, uma das técnicas mais estudadas atualmente é a biodegradação, ou seja, a utilização de grupos microbianos capazes de degradar hidrocarbonetos. Este método torna-se efetivo uma vez que os componentes do petróleo são usados como fonte de carbono através dos processos microbianos, resultando na quebra das moléculas em compostos de baixa massa molecular (ZHANG *et al.*, 2005).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver uma estratégia para a biodecomposição dos compostos monoaromáticos em água, através da análise da capacidade de biorremediação da *Pseudomonas aeruginosa*. De maneira mais específica, esse trabalho pretendeu desenvolver uma cepa bacteriana da espécie estudada que fosse adaptada à degradação de hidrocarbonetos, além de avaliar a cinética de crescimento e consumo de carbono do microrganismo, como também, determinar seu potencial de biorremediação, utilizando a técnica de bioaugmentação.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Petróleo e seus derivados

O Petróleo é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, de cheiro característico e cor variando entre o negro e o castanho escuro. Ele é uma fonte de energia não renovável e de origem fóssil, cuja formação se deu a milhões de anos a partir da decomposição de pequenos organismos marinhos, plâncton e vegetação típica de regiões alagadiças (FONSECA, 1992).

Devido à permeabilidade e à porosidade das rochas sedimentares, suas bacias são os principais locais de ocorrência de petróleo, com a formação de grandes reservatórios economicamente exploráveis (RAMOS, 2006). Todavia, ele não necessariamente permanece na rocha em que foi gerado, a rocha matriz, e geralmente migra para outras localidades até encontrar um terreno apropriado, denominado rocha reservatório.

Em geral, todas as formas do petróleo são compostas quase que completamente por átomos de carbono e de hidrogênio, com menores proporções de nitrogênio e oxigênio (SOLOMONS, 1996). A partir da Tabela 1 é possível observar os elevados percentuais de carbono e hidrogênio, mostrando que os hidrocarbonetos são os compostos predominantes.

Tabela 1: Análise elementar do petróleo.

Elemento	% em massa
Hidrogênio	11 - 14
Carbono	83 - 87
Enxofre	0,06 – 8
Nitrogênio	0,11 – 1,7
Oxigênio	0,1 – 2
Metais	Até 3

Fonte: Thomas (2001).

Esses hidrocarbonetos podem ser divididos em quatro frações: alifáticos, aromáticos, resinas e asfaltenos. As duas primeiras caracterizam-se por serem mais

leves, enquanto as outras duas compreendem as frações mais pesadas. A fração dos compostos alifáticos inclui os alcanos, alcenos e cicloalcanos. Já a fração dos compostos aromáticos compreende os hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis, tais como benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xilenos (BTEX) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), como os nafteno-aromáticos. As resinas e os asfaltenos são constituídos de moléculas polares contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio, no entanto, as resinas são caracterizadas por serem sólidos amorfos dissolvidos no óleo, enquanto os asfaltenos são grandes moléculas coloidais dispersas no óleo (BALBA *et al.*, 1998). No petróleo, podem-se encontrar também traços de metais como vanádio, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio, mas a proporção destes metais, bem como das demais frações do petróleo, podem estar associadas à formação geológica do local de origem, ao tempo decorrido e a migração do mesmo (RAMOS, 2006).

No reservatório, a mistura está em equilíbrio sob severas condições de temperatura e pressão, porém, quando submetidas às condições de superfície, este equilíbrio é deslocado e promove a separação de fases. A fração que permanece no estado líquido, sob as condições de superfície, é denominada óleo, enquanto a fração na fase gasosa é chamada de gás natural ou simplesmente gás. O tipo de hidrocarboneto gerado, óleo ou gás, é determinado por dois fatores: constituição da matéria orgânica original e intensidade do processo térmico durante a formação do reservatório (SILVA, 2010).

Desta forma, dependendo da origem do petróleo, a composição química e as propriedades físicas do óleo bruto podem variar de forma abrangente, e é devido a esses fatores que existem dificuldades para o tratamento de áreas contaminadas com essa substância.

2.2 Água produzida

A água produzida é um subproduto da produção de hidrocarbonetos em reservatórios subterrâneos, sendo assim, esse termo é usado para toda água carregada junto com o óleo. Sua origem está relacionada aos seguintes fatores: a água presente, inicialmente, na própria formação, também chamada de água conata; aos aquíferos provenientes das formações adjacentes ou ligada diretamente as rochas portadoras de

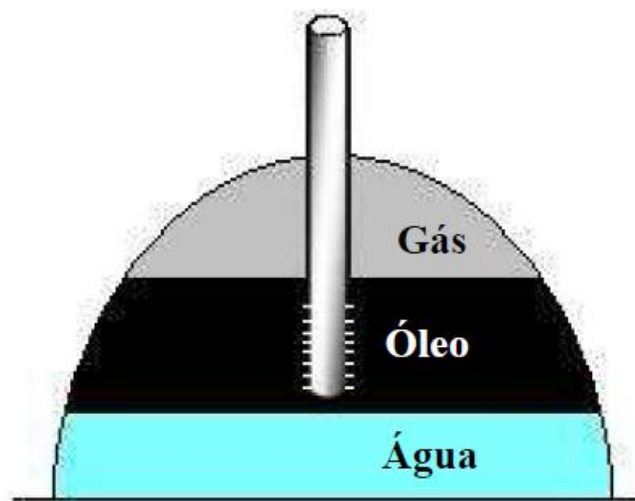
hidrocarbonetos; e, por fim, da água e/ou vapor injetados nos poços como mecanismos de recuperação (SILVA, 2010).

A composição ou qualidade, da água produzida pode variar consideravelmente. Dois fatores influenciam de forma significativa suas características físicas, químicas e biológicas, são eles a formação geológica e a localização geográfica do reservatório (STEWART & ARNOLD, 2011), estando também intimamente ligada à composição do petróleo (FAKHRU'LRAZI et al., 2009). Este tipo de água residuária é corrosiva e possui, geralmente, alta salinidade, contendo óleo, compostos refratários, orgânicos solúveis e insolúveis, gases dissolvidos, metais pesados, traços de produtos químicos adicionados na linha de separação/produção e temperatura elevada. Dos componentes mencionados, a remoção de óleo é uma das principais variáveis no tratamento deste efluente. Na água produzida, o óleo pode estar presente em quatro formas distintas: livre, disperso, emulsionado e dissolvido (FERNANDES JR., 2006).

- Livre: constitui uma fase diferente da fase água, não estando intimamente associada a esta e com diâmetro da gota superior a 150 μm . É uma mistura instável podendo ser separada por processos de separação gravitacional.
- Disperso: óleo disperso sob a forma de gotas de grandes diâmetros, acima de 100 μm . É formado por hidrocarbonetos praticamente insolúveis, tais como aromáticos, polinucleares, policicloparafinas e parafinas pesadas. O óleo livre pode ser facilmente removido da água, através de separadores gravitacionais.
- Emulsionado: óleo disperso presente sob a forma de gotas de pequenos diâmetros, variando entre 100 e 20 μm . É também formado por hidrocarbonetos praticamente insolúveis. Essa forma de óleo é mais difícil de ser separada da água. De fato, os diâmetros das gotas de emulsão podem atingir valores bem pequenos, na faixa de micrômetros ou submicrômetros (SPIELMAN & SU, 1977; HONG; FANE; BURFORD, 2002).
- Dissolvido: de remoção extremamente difícil, requerendo o uso de processos químicos e/ou biológicos. Composto pelos hidrocarbonetos menos insolúveis na água, como BTEX e por fenóis.

Ao longo da vida produtiva de um reservatório pode coexistir a produção de hidrocarbonetos e água, como mostrado na Figura 1. A quantidade de água que será produzida é função das condições em que ela se apresenta no meio poroso, sendo que a fração de água produzida, associada ao óleo, cresce no decorrer do tempo. Diante disso, a água de produção representa a corrente de efluentes líquidos de maior volume das atividades de produção de petróleo, podendo ultrapassar frações de 90% em volume em alguns poços maduros (AMINI *et al.*, 2012).

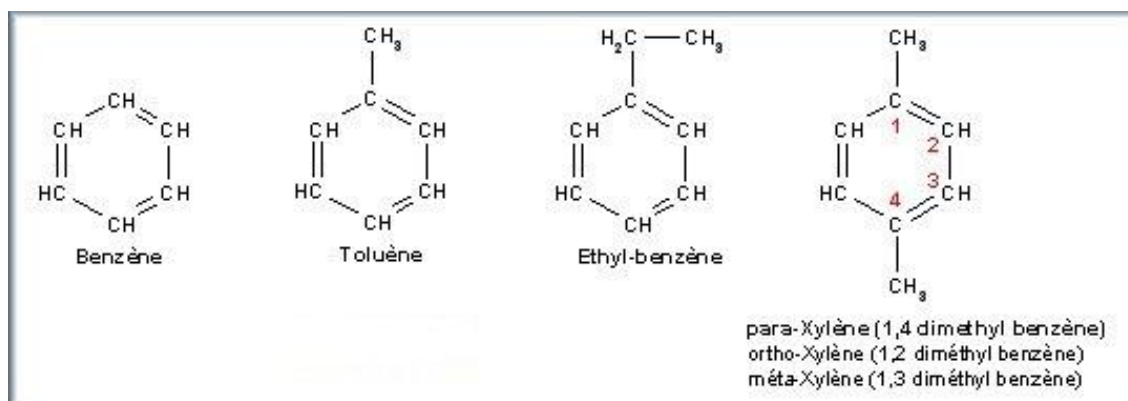
Figura 1: Esquema de um reservatório de óleo.



Fonte: SILVA, 2010.

De acordo com OGP (2002), existem ainda variações qualitativas quanto à composição de águas oriundas de campos de produção de gás e de óleo. O teor de hidrocarbonetos aromáticos de baixa massa molar, como o grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) representado na Figura 2, se apresenta em maior concentração em campos de gás.

Figura 2: Fórmula estrutural dos aromáticos do grupo BTEX.



2.3 Impactos ambientais

A indústria do petróleo é responsável por muitos impactos ambientais, decorrentes de vazamentos, derrames e outros acidentes que podem acontecer durante as atividades de exploração, refino, transporte e armazenamento do petróleo e de seus derivados, prejudicando consideravelmente o meio ambiente (CALLADO; SILVA; LOPES, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O descarte da água produzida pode causar danos ambientais para as águas de superfície e subterrâneas e para o solo devido a sua toxicidade e carga orgânica. Ahmadun *et al.* (2009) mencionam os principais efeitos sobre o meio ambiente: aumento da salinidade; presença de óleo acarretando aumento da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e da toxicidade aguda e crônica; e, dependendo da origem e da formação geológica pode ocorrer a presença de radionuclídeo.

As águas residuárias oriundas de indústrias de refino também apresentam uma diversidade de poluentes orgânicos e inorgânicos de difícil degradação, incluindo compostos fenólicos, sulfetos, amônia, cianetos, metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos (ALVA-ARGÁEZ; KOKOSSIS; SMITH, 2007; AVCI; KAÇMAZ; DURAK, 2003; MILHOME, 2006; SOUSA *et al.*, 2006), os quais podem ser tóxicos para diversos organismos e potencialmente carcinogênicos (ALAJBEG *et al.*, 2000; BARRON *et al.*, 1999; MARIANO, 2001).

Dentre estes poluentes, os compostos monoaromáticos BTEX se destacam na lista de poluentes devido ao seu elevado potencial carcinogênico e mutagênico, além de possuir elevada solubilidade em água, o que facilita a migração e contaminação rápida

de águas subterrâneas, solos e ar por esses compostos, que, mesmo em baixas concentrações (na ordem de micrograma por litro), podem trazer sérios danos ao meio ambiente e à saúde humana (AIVALIOTI *et al.*, 2011; MAZZEO *et al.*, 2010; PAIXÃO *et al.*, 2007; JO *et al.*, 2008; SANTAELLA *et al.*, 2009).

Portanto, a disposição das águas residuárias oriundas do processamento do petróleo, bem como o derramamento de combustíveis nos corpos hídricos receptores ou no solo, tem se tornado uma preocupação constante a nível mundial (CARNEIRO, 2012; MARIANO, 2001).

Em território brasileiro, o descarte de água produzida é regulamentado pela resolução 393/07 e 430/11 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) que prevê que a água produzida somente poderá ser lançada, direta ou indiretamente, no mar desde que obedeça as condições, padrões e exigências estabelecidos na referida resolução. Nesta resolução, o único parâmetro com limites definidos para descarte é o Total de Óleos e Graxas (TOG) que deve obedecer a concentração média mensal de até 29 ppm, com valor máximo diário de 42 ppm (THOMAS, 2001).

2.4 Gerenciamento e tratamento da água produzida

A alternativa a ser adotada para tratamento e destino da água produzida depende de vários fatores, tais como a localização da base de produção, legislação, viabilidade técnica, custos e disponibilidade de infraestrutura e de equipamentos.

Porém, a água de produção, seja ela vista como subproduto ou como resíduo deve ser tratada. O objetivo da fase inicial do tratamento é a recuperação do óleo presente na fase aquosa. No entanto, sabe-se que a recuperação total não é possível. Neste caso, tecnologias eficientes e de baixo custo devem ser utilizadas para remover/eliminar a fração remanescente de óleo a fim de possibilitar o reuso de efluentes (SILVA, 2010).

A escolha do sistema mais adequado é definida pelo destino final que se pretende dar às águas residuárias. Algumas variáveis como vazão e características químicas, físico-químicas e biológicas do efluente interferem diretamente sobre o custo do tratamento e este, por sua vez, tem papel fundamental na seleção das rotas dos processos. Quando se diz respeito ao tratamento de efluentes líquidos, os parâmetros comumente monitorados são temperatura, teor de sólidos suspensos, voláteis e

dissolvidos, cor, pH, turbidez, Total de Óleos e Graxas (TOG), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Carbono Orgânico Total (TOC), nutrientes, salinidade e teor de metais pesados.

Uma das grandes utilizações para a água produzida é sua reinjeção, pois ela é vantajosa em dois aspectos, segundo Souza & Furtado (2006). Pois, através da reinjeção pode haver redução de custos importantes com o arrefecimento da captação de água, além da economia de água de boa qualidade (aquíferos) que normalmente é utilizada com essa finalidade. O reuso da água de produção também reduz o descarte de resíduos ao meio ambiente.

Apesar do uso da água produzida para reinjeção apresentar vantagens e ser adotada nos Estados Unidos desde a década de 40 e pela Petrobrás desde a década de 60, a opção mais utilizada continua sendo o descarte (SOUZA & FURTADO, 2006).

Diante disso, o tipo de processo a ser adotado para o tratamento da água produzida depende dos compostos que se deseja remover. Os compostos a serem removidos, por sua vez, dependem do destino final a ser adotado que, conforme citado anteriormente, pode ser descarte ou injeção.

Todavia, seja qual for o destino final, a remoção do óleo é o fator de principal interesse desses métodos de tratamento. Mas, diante dessa situação, os compostos dissolvidos merecem maior atenção, pois são certamente os maiores causadores de poluição nos meios aquáticos onde as águas produzidas são descartadas, principalmente os hidrocarbonetos monoaromáticos.

2.5 Hidrocarbonetos monoaromáticos

Os hidrocarbonetos monoaromáticos, tais como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), são encontrados em derivados de petróleo e largamente utilizados em indústrias químicas como matérias-primas para síntese de outros produtos (PHELPS; YOUNG, 2001; RIBEIRO, 2005). O benzeno, por exemplo, é utilizado na produção de borrachas, plásticos, náilon, pesticidas e tintas, enquanto o tolueno é geralmente usado como agente de diluição de tintas e como solvente na produção de resinas, colas e óleos. O etilbenzeno, por sua vez, é usado na produção do estireno e polímeros sintéticos, e os xilenos, como solventes em borrachas e no tingimento de couro, além de serem utilizados na produção do anidrido ftálico, bactericidas, herbicidas, óleos lubrificantes e

ácido para-ftálico. (TRIGUEROS, 2008). Além disso, os compostos BTEX são os hidrocarbonetos mais abundantes da gasolina, podendo representar uma parcela de 18% a 25% em massa (ANP, 2004). No petróleo cru, o teor médio desses compostos é de 40 mg/L, contudo suas concentrações podem chegar à ordem de 1000 mg/L, dependendo do poço produtor (FANG; LIN, 1988).

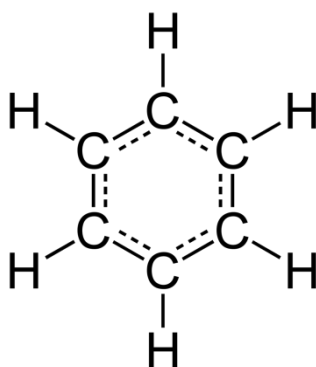
Os hidrocarbonetos monoaromáticos apresentam elevada solubilidade em água, quando comparados a outros hidrocarbonetos, e também maior mobilidade em sistemas solo-água devido ao seu menor coeficiente de partição octanol-água. Logo, é observada baixa adsorção no solo e transporte preferencial pela água, favorecendo a contaminação de mananciais de abastecimento superficiais ou subterrâneos. Normalmente, essa mobilidade é aumentada pelo efeito de cossolvência causado pela adição de etanol na gasolina comercializada no Brasil (SILVA *et al.*, 2002, TIBURTIUS *et al.*, 2004, RESENDE, 2007).

Estas substâncias têm alto potencial poluidor, elevada toxicidade e são depressoras do sistema nervoso central (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996). E devido à sua elevada volatilidade, os BTEX geralmente se encontram em baixas concentrações (nível de ppb) em águas superficiais. No entanto, em águas subterrâneas essas concentrações podem ser mais elevadas, sendo, então, prioridade o monitoramento desses compostos em lençóis subterrâneos, os quais podem ser fonte de água destinada ao consumo humano (FALCÓ; MOYA, 2007; MAZZEO *et al.*, 2010).

2.5.1 Benzeno

O benzeno, à temperatura ambiente, é um líquido volátil, estável e incolor. Tem cheiro característico e ponto de ebulição de 80,1°C. É altamente inflamável e pouco solúvel em água, porém solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Na Figura 3 abaixo é possível observar sua fórmula estrutural.

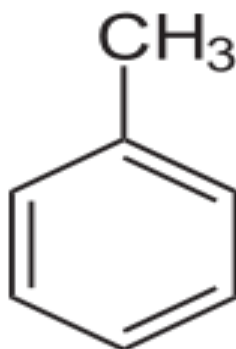
No ambiente, em virtude de sua elevada volatilidade, o benzeno tende a se acumular no ar, seja a partir da água, do solo ou dos sedimentos. No entanto, é removido da atmosfera retornado para a água e solo durante períodos de chuva.

Figura 3: Fórmula estrutural do benzeno.

Dentre os BTEX, aquele que confere maior risco à saúde humana é o benzeno. Muitas pesquisas laboratoriais com animais e estudos epidemiológicos em humanos mostraram a relação causal entre a exposição ao benzeno e a ocorrência de doenças como a leucemia linfóide, leucemia mielomonocítica, neoplasmas hematológicos e distúrbios sanguíneos, como a pré-leucemia e anemia apática. Além dessas doenças, experimentos com animais comprovaram o aumento do risco de tumores em múltiplas espécies, em múltiplos órgãos (fígado, estômago, pulmões, ovários, e glândulas mamárias), distúrbios mentais, psiconeuróticas e de personalidade. Observaram-se também ligeiros transtornos digestivos, e, no caso das mulheres, houve transtornos da menstruação. Uma exposição aguda por inalação ou ingestão pode causar até mesmo a morte de uma pessoa (MELLO *et al.*, 2006; MENDES, 1993; PEDROZO *et al.*, 2002; TIBURTIUS *et al.*, 2004; MELLO, 2007).

2.5.2 Tolueno

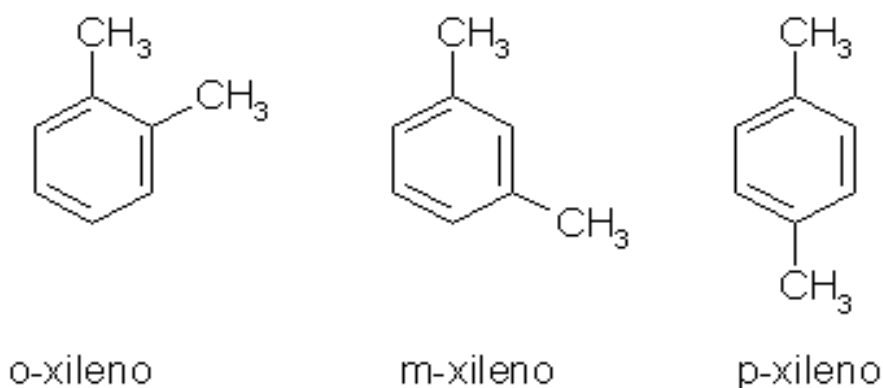
O tolueno é o nome usual do metil-benzeno. Este composto ocorre naturalmente no óleo cru, é um líquido transparente, inflamável, estável à temperatura ambiente e sob condições normais de uso. Apresenta ponto de ebulição de 110,6°C e é pouco solúvel em água. Na Figura 4 abaixo é possível observar sua fórmula estrutural.

Figura 4: Fórmula estrutural do tolueno.

O tolueno é comumente encontrado em locais onde se despejam resíduos líquidos. Este, mesmo em baixas concentrações, gera fadiga, fraqueza e confusão mental, além de ser um depressor do sistema nervoso central (PEDROZO *et al.*, 2002; TIBURTIUS *et al.*, 2004).

2.5.3 Xileno

Os xilenos são também conhecidos como dimetilbenzeno ou para-xileno e seus derivados orto-xileno e meta-xileno. Este composto, praticamente insolúvel em água, é um líquido transparente que produz um vapor irritante e inflamável, com ponto de ebulição de 138°C a 144°C, dependendo da sua conformação. Na Figura 5 abaixo é possível observar sua fórmula estrutural.

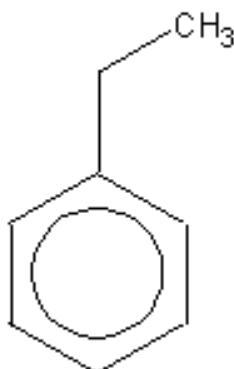
Figura 5: Fórmula estrutural do xileno.

Os xilenos podem causar transtornos da visão, diminuição da coordenação, irritação no nariz e garganta, e cefaleia, bem como fadiga, nervosismo, insônia, irritabilidade, náuseas e emagrecimento (PEDROZO *et al.*, 2002; TIBURTIUS *et al.*, 2004).

2.5.4 Etilbenzeno

O etilbenzeno é um líquido incolor, inflamável e com odor semelhante ao da gasolina, utilizado principalmente na produção de estireno, e apresenta ponto de ebulição de 136°C. Menos de 1% do composto é empregado como solvente para tintas ou intermediário na fabricação de dietilbenzeno e acetofenona. Na Figura 6 abaixo é possível observar sua fórmula estrutural.

Figura 6: Fórmula estrutural do etilbenzeno.



A principal via de exposição humana ao etilbenzeno é a inalação de vapor e/ou névoa, embora possa ocorrer por contato dérmico e por ingestão. A exposição à curto prazo pode irritar os olhos, nariz e via aérea superior, e causar vermelhidão e bolhas na pele, fadiga, tontura e falta de coordenação. Na exposição prolongada, é capaz de ocasionar fadiga, cefaléia, irritação dos olhos e da via aérea superior e o contato dérmico repetido pode causar ressecamento e dermatite. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica o etilbenzeno como possível cancerígeno humano com base em estudos que evidenciaram aumento na incidência de adenomas em animais expostos por via inalatória.

Logo, diante dos sérios riscos ao meio ambiente e à saúde humana, a legislação tem se tornado cada vez mais restritiva quanto à presença dos BTEX em águas. O Ministério da Saúde (Portaria nº 2.914/2011) estabelece limites máximos para a concentração de benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros do xileno em águas destinadas ao consumo humano. A legislação brasileira determina que não haja concentração maior que $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $170 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, respectivamente (BRASIL, 2011). Segundo Fernandes (1997), em qualquer vazamento, as concentrações de compostos tóxicos alcançam valores três mil vezes superiores.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) preocupado com a disposição de esgotos industriais, entre os quais os provenientes da indústria do petróleo, criou a Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011, a qual impõe o limite para o lançamento em corpos hídricos de $1,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $1,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $0,84 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, respectivamente (BRASIL, 2011). Assim, a má disposição das águas residuárias, aliada à presença de compostos monoaromáticos, pode acarretar uma série de danos à fauna, flora e aos humanos.

2.6 Processos de remoção e tratamento de compostos monoaromáticos

Atualmente, existe uma grande procura por tecnologias de tratamento que sejam capazes de remover esses compostos de águas e que atendam a uma série de fatores, dentre os quais se podem apontar a busca por processos mais eficientes, atendimento às exigências ambientais, processos menos onerosos, unidades mais compactas que operem com maior flexibilidade e com boa eficiência, menor custo de instalação e manutenção (MELLO, 2007).

Devido à grande mobilidade dos BTEX em água, esses compostos podem alcançar os lençóis freáticos, vindo a contaminar grande quantidade de água potável em um curto intervalo de tempo, o que representa um grande risco ambiental e de saúde pública (COATES; ANDERSON, 2000; DOU *et al.*, 2008; FARHADIAN *et al.*, 2009). Diante disso, muitos tipos de tecnologias convencionais e avançadas vêm sendo utilizadas na tentativa de tratamento e remediação de áreas contaminadas.

Existem métodos não biológicos (físicos, químicos e físico-químicos) e biológicos aplicados na remoção de BTEX presentes em águas contaminadas. Esses

métodos podem ainda ser divididos em tecnologias *in situ* (remoção realizada no próprio ambiente contaminado) ou *ex situ* (remoção do material contaminado para tratamento em local externo ao de sua origem) (FARHADIAN *et al.*, 2008). A Tabela 2 apresenta algumas das principais tecnologias *in situ* e *ex situ* de remediação de ambientes contaminados, e algumas delas serão detalhadas adiante.

Tabela 2: Tecnologia de remediação de áreas contaminadas.

Método	In situ	Ex situ
Físico	Barreira	Air stripping
	Contenção hidráulica	Filtração (membrana)
	Air sparging	Adsorção
Químico	Injeção de oxidantes químicos	Coagulação
		Floculação e precipitação
		Processos oxidativos avançados (POAs)
Biológico	Biorremediação	Biorremediação

FONTE: FARHADIAN *et al.*, 2008

2.6.1 Processos não biológicos

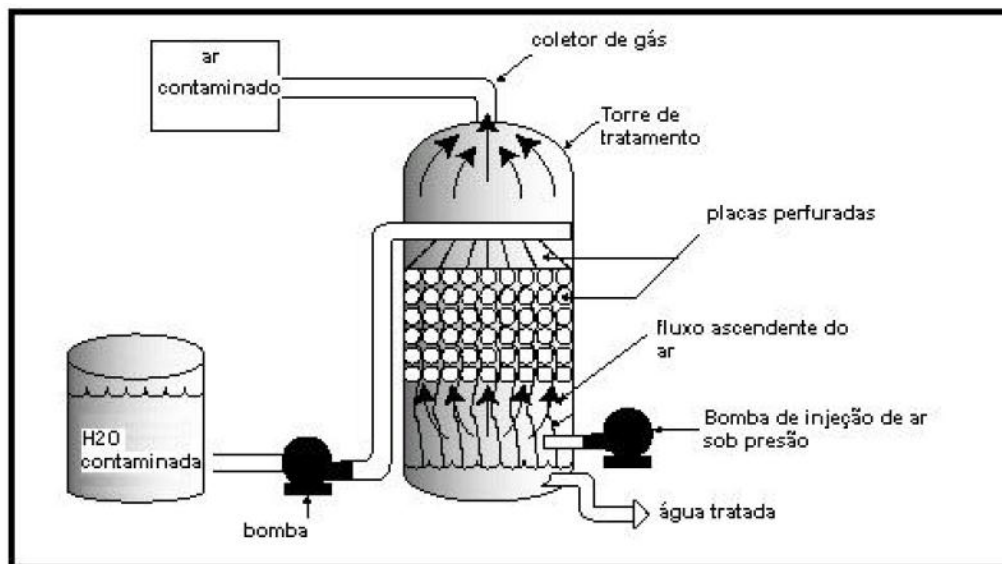
Os processos não biológicos utilizados na remoção de hidrocarbonetos incluem a adsorção em carvão ativado ou zeólita, air stripping, oxidação fotocatalítica, extração de vapor do solo, filtração por membranas, clarificação química, barreiras reativas, dentre outros (AYOTAMUNO *et al.*, 2006; FARHADIAN *et al.*, 2008; SHAH; NOBLE; CLOUGH, 2004; VIDAL, 2011). Cada uma dessas tecnologias apresenta suas vantagens e desvantagens e, em geral, os processos físicos permitem uma eficiente remoção dos hidrocarbonetos voláteis. Entretanto, o seu caráter não-destrutivo implica na necessidade de processos auxiliares, orientados a adsorver, degradar ou dispor os hidrocarbonetos previamente extraídos (DOS SANTOS, 2012). Dentre as tecnologias mais utilizadas para degradação de BTEX podem-se considerar os processos oxidativos avançados, air stripping e zeólitas.

2.6.1.1 Air stripping

Air stripping é o processo que força a passagem do ar através da água contaminada bombeada do aquífero removendo desta forma os compostos (EPA,2001).

O sistema consiste em uma torre contendo várias placas perfuradas paralelas no sentido vertical, como mostrado na Figura 7.

Figura 7: Modelo do sistema de Air Stripping.



FONTE: EPA, 2001.

A água contaminada é introduzida na parte superior da torre enquanto o ar é bombeado sob pressão na parte inferior. O ar ascendente faz com que os compostos químicos dissolvidos na água passem para o estado de vapor e o gás é então coletado e posteriormente tratado (EPA, 2001). O Air stripping é usado geralmente associado com o sistema de Bombeamento (PT – Pump and Treat).

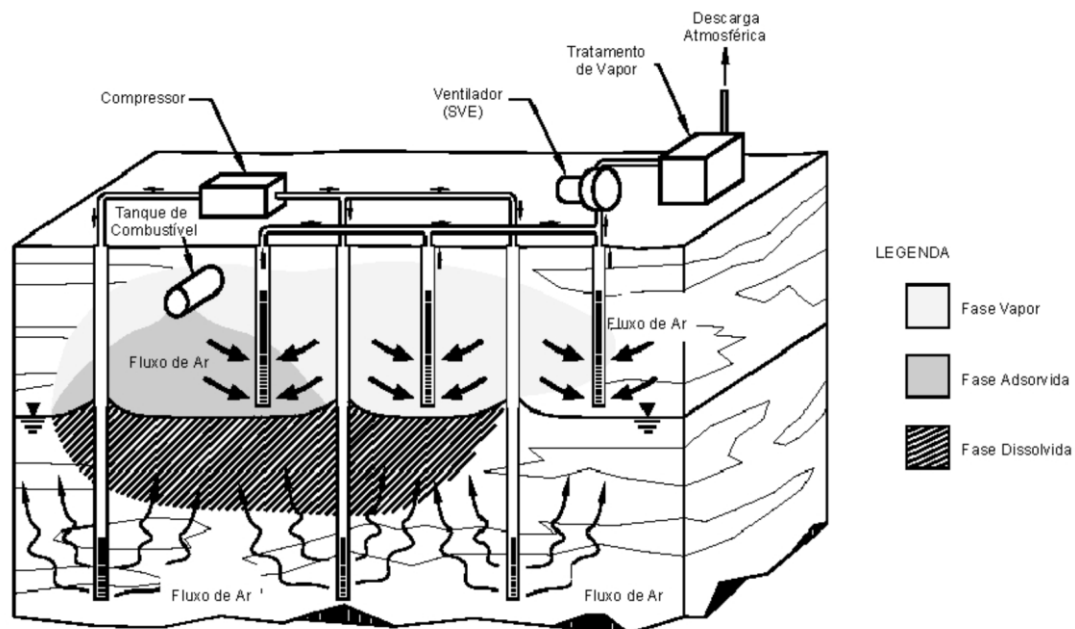
Shah, Noble e Clough (2004) estudaram a eficiência da técnica de air stripping na remoção de compostos orgânicos voláteis (COV), incluindo os BTEX, e concluíram que, apesar de o sistema ser bastante utilizado em indústrias petroquímicas e demonstrar boa eficiência de remoção, tal técnica não era muito indicada sob o ponto de vista ambiental, já que havia apenas uma transferência dos poluentes da fase líquida para a gasosa, e não a sua degradação (TIBURTIUS; PÉRALTA-ZAMORA; LEAL, 2004).

2.6.1.2 Air sparging

Air sparging é uma tecnologia in situ, que introduz ar no aquífero contaminado para produzir borbulhamento na água criando uma aeração que remove os

contaminantes por volatilização (DONAIRE, 2007). O sistema está representado na Figura 8.

Figura 8: Modelo do sistema de Air Sparging.



O Air Sparging deverá ser utilizado em conjunção com um sistema de Extração de Vapores (SVE). A eficiência do método é função da permeabilidade gasosa na zona não saturada, taxa de fluxo d'água, permeabilidade do aquífero, volatilidade do contaminante e a sua solubilidade.

2.6.1.3 Contenção hidráulica

A contenção hidráulica consiste na construção de barreiras impermeáveis verticais, cujo objetivo é conter o deslocamento das águas subterrâneas, seja a montante ou a jusante da área contaminada, evitando o espalhamento da contaminação.

Nesse caso, a barreira vertical representa uma fase do processo de contenção, uma vez que há necessidade de bombear a pluma contaminada e efetivamente tratar a água subterrânea. Dentre as vantagens dessa metodologia, destaca-se a possibilidade de manter a contaminação em um único terreno, o que permite melhor gerenciamento da área, facilitando a adoção de medidas técnicas.

2.6.1.4 Processos oxidativos avançados (POA)

Os Processos Oxidativos Avançados são definidos como processos de oxidação em que radicais hidroxila são gerados para atuar como agentes oxidantes químicos e, devido à alta reatividade destes radicais, podem reagir com uma grande variedade de compostos orgânicos.

Os POA apresentam-se como uma alternativa de tratamento de solo e águas subterrâneas devido ao alto potencial de mineralização dos poluentes orgânicos, transformando-os em dióxido de carbono, água e ânions inorgânicos. As reações envolvidas neste processo baseiam-se na geração de radicais hidroxila (-OH), que são espécies altamente oxidantes e tem como característica a não seletividade, podendo degradar inúmeros compostos. Os radicais hidroxila podem ser gerados por reações envolvendo oxidantes fortes, como ozônio (O₃) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), semicondutores como o dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de zinco (ZnO), e radiação ultravioleta (UV) (HERRMANN, 2004).

Os radicais hidroxila podem ser gerados por vários POA, que podem ser classificados em sistemas homogêneos ou heterogêneos, conforme a ausência ou a presença de catalisadores na forma sólida.

2.6.2 Processos biológicos

É importante ressaltar que a recuperação de áreas contaminadas por métodos tradicionais é uma tarefa complexa e bastante demorada, e não se apresenta como um método efetivo, pois a contenção e recolhimento através de barreiras flutuantes, por exemplo, não promovem a degradação do petróleo. Outro fator complicador é o custo, que pode se mostrar um valor consideravelmente alto para o setor de revendedores de combustíveis. Os custos são função do tipo de contaminante, das características do local e da amplitude da área.

Diante disso e devido a uma crescente preocupação e conscientização da sociedade em relação à qualidade ambiental, a população vem se tornando mais crítica e participativa, exigindo atuações cada vez maiores das autoridades. Assim, vários recursos estão sendo disponibilizados para o desenvolvimento de novas tecnologias de remediação e limpeza.

Entre as várias tecnologias disponíveis para o tratamento de efluentes contendo hidrocarbonetos monoaromáticos, os tratamentos biológicos vêm recebendo grande destaque, pois, além de apresentar menor consumo de energia, podem ser potencialmente eficientes, haja visto que a mineralização promove a destruição permanente dos resíduos e elimina os riscos de futuras contaminações, aumentando o nível de aceitação por parte da opinião pública (SHIM, SHIN, YANG, 2002; NETO *et al.*, 2006; VIDALI, 2001). Ademais, os processos biológicos podem ser combinados a outros processos para o aumento da eficiência global do tratamento (MELLO, 2007; NETO *et al.*, 2006).

No Brasil, a técnica de biorremediação ainda é pouco utilizada, porém, promissora se aplicada nas áreas contaminadas. Este é um método que pode ser aproveitado no mercado brasileiro, pois o país apresenta solos e temperaturas favoráveis.

2.6.2.1 Biorremediação

A biorremediação consiste na utilização de grupos microbianos capazes de degradar hidrocarbonetos. Esses microrganismos possuem a capacidade de biotransformar moléculas poluentes em nutrientes para a realização de suas funções metabólicas e fisiológicas. Os processos biológicos de degradação (biodegradação) dos compostos orgânicos são realizados por meio da quebra desses compostos em produtos menos tóxicos, tais como CO₂, água e metano (BITTKAU *et al.*, 2004; FARHADIAN *et al.*, 2009; MARTÍNEZ; CUERVO-LÓPEZ; GOMEZ, 2007; MELLO, 2007).

O objetivo da biorremediação é mineralizar os poluentes, liberando apenas substâncias inertes, como dióxido de carbono e a água. Este processo se baseia em três aspectos principais: a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; a disponibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático e condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador. (PEREIRA e LEMOS, 2013).

A estrutura química dos poluentes orgânicos tem uma profunda influência na habilidade dos microrganismos metabolizarem estas moléculas, especialmente com respeito às taxas e extensão da biodegradação. Alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados enquanto outros são recalcitrantes (não biodegradáveis).

Hidrocarbonetos com baixo a médio peso molecular e álcoois são exemplos de compostos facilmente biodegradáveis. Compostos xenobióticos (espécies químicas fabricadas pelo homem), especialmente hidrocarbonetos halogenados, tendem a ser resistentes à biodegradação. Compostos ramificados e polinucleados são, geralmente, mais difíceis para degradar que moléculas monoaromáticas ou com cadeias simples, e, conforme aumenta o grau de halogenação da molécula, diminui-se a biodegradabilidade (ATLAS, 1986).

Apesar de fundamentada em um único processo básico (biodegradação), as técnicas de biorremediação envolvem variações de tratamentos. Ele pode ser realizado em dois tipos de biotecnologias: *in-situ* (no local) ou *ex-situ* (fora do local). As tecnologias *in-situ* apresentam baixos custos e facilidade operacional, boa eficiência e a redução da formação de subprodutos tóxicos. Entretanto, são técnicas que não estão sob condições controladas, fazendo com que as variáveis presentes no meio possam interferir negativamente no processo de tratamento, além de também requerem um longo tempo para obterem bons resultados de eficiência de remoção (DOTT *et al.*, 1995).

O processo *ex-situ*, que pode ser conduzido por meio de reatores biológicos sob condições controladas como pH, temperatura, aeração e agitação, tem se mostrado bastante eficiente na remoção dos principais poluentes orgânicos presentes na gasolina (GUIEYSSE *et al.* 2000; KRYST e KARAMANEV, 2001; OHLEN *et al.*, 2005; ZILOUEI *et al.*, 2006), inclusive os monoaromáticos (BTEX) (CATTONY *et al.*, 2005; DE NARDI *et al.*, 2005; DOU *et al.*, 2008; FARHADIAN *et al.*, 2008; GUSMÃO *et al.*, 2007; JO *et al.*, 2008; MARTÌNEZ; CUERVO-LÓPEZ; GOMEZ, 2007).

Estas técnicas podem envolver inúmeros procedimentos, os quais foram listados na Tabela 3. A maioria dessas estratégias se aplica aos tratamentos de superfície, enquanto algumas são específicas para a biorremediação em solos e água subterrânea como é o caso da bioventilação.

Tabela 3: Tipos e estratégias de biorremediação

Biorremediação	Fundamentos e Definições
Passiva ou natural	Consiste na degradação intrínseca ou natural pelos organismos naturais do solo.
Bioestimulação	Consiste na adição de nutrientes, como N e P, para estimular os microrganismos indígenas.
Bioventilação	É uma forma de bioestimulação por adição de gases estimulantes como O ₂ e CH ₄ , para aumentar a atividade microbiana decompositora.
Bioaugmentação	É a inoculação do local contaminado com microrganismos selecionados para degradação do contaminante.
“Landfarming”	É a aplicação e incorporação de contaminantes ou rejeitos contaminados na superfície do solo não contaminado para degradação.
Compostagem	É o uso de microrganismos termofílicos aeróbios em pilhas construídas para degradar o contaminante.

Fonte: Moreira e Siqueira (2002)

Algumas técnicas de biorremediação podem ser utilizadas em todas as tecnologias, visando à otimização do processo de degradação dos poluentes pelos microrganismos. Dentre estas se destacam: a adição de nutrientes (bioestimulação), que aumenta a atividade microbiana nativa, e a adição de linhagens microbianas exógenas degradadoras (bioaugmentação) (RAIMUNDO e RIZZO, 2002).

2.6.2.1.1 Atenuação natural

O conjunto desses processos naturais de eliminação de contaminantes é denominado biorremediação intrínseca ou passiva, também chamada de atenuação natural (JACQUES *et al.*, 2007). Assim como a volatilização, diluição, absorção por vegetais e adsorção (raízes, matéria orgânica e solo), a biodegradação é um mecanismo natural de atenuação de contaminantes no ambiente, mas o único capaz de transformá-los em compostos inóculos à saúde (CORSEUIL & MARINS, 1998).

A remediação natural é uma abordagem para a descontaminação tanto de solos como de águas subterrâneas que está ganhando aceitação, principalmente quando usada em locais contaminados por derramamento de derivados de petróleo, como é o

caso dos postos de combustíveis. Por serem os contaminantes compostos de origem natural, espera-se que sejam facilmente degradados pela microbiota nativa do solo e transformados em substâncias inertes, CO₂ e água (JACQUES *et al.*, 2007; ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2007).

Esse processo consiste na remediação de um poluente sem acréscimo de nutrientes ou adequação de qualquer condição ambiental, e pode ocorrer de maneira contínua devido à adaptação natural da microbiota nativa do solo impactado. Esses microrganismos passam então a utilizar o composto orgânico poluente como fonte de carbono, ocasionando assim uma redução da sua concentração ao longo do tempo. Além disso, o solo contaminado é sujeito ao processo de intemperização natural onde não só os processos biológicos estão envolvidos, mas também processos físicos e químicos são responsáveis pela redução da concentração de poluente no solo (lixiviação, volatilização, etc.). No entanto, o tempo envolvido no processo de atenuação natural costuma ser bastante longo (meses ou anos) o que torna necessário, muitas vezes, a remoção do solo impactado e encaminhamento do mesmo para tratamento ex-situ (BAPTISTA e RIZZO, 2004).

A partir dos estudos de avaliação do processo de atenuação natural, percebeu-se que não é possível que todo o conteúdo de hidrocarbonetos provenientes do petróleo seja completamente mineralizado a CO₂ no solo usando a descontaminação biológica. A biodegradação de 10 a 30% dos hidrocarbonetos no solo pode ser limitada pela incapacidade dos microrganismos autóctones em metabolizá-los eficientemente, seja pela falta de nutrientes, pela ausência de degradadores específicos ou pela baixa acessibilidade dos compostos aos microrganismos degradadores, uma vez que os contaminantes tanto podem incorporar-se ao material orgânico natural do solo quanto difundir-se dentro de poros muito pequenos do solo, ou até mesmo pela água, principalmente devido à mistura com o etanol (JACQUES *et al.*, 2007).

Condições ambientais desfavoráveis à sobrevivência e atividade dos microrganismos degradadores no solo também são capazes de limitar a biodegradação. A umidade, por exemplo, é considerado o fator mais importante no processo de biodegradação, pois uma alta atividade microbiana só ocorre se houver uma adequada disponibilidade de água, visto que o teor de água no solo se relaciona inversamente com a disponibilidade de oxigênio e, conseqüentemente, com a atividade dos microrganismos aeróbicos. Temperaturas abaixo de 25°C e acima de 35°C também

afetam a atividade microbiana, enquanto que o pH do solo é capaz de comprometer diretamente a atividade dos microrganismos através dos efeitos dos íons H^+ na permeabilidade celular e na atividade enzimática. O efeito do pH também pode influenciar a disponibilidade de macro e micronutrientes e, inclusive, na solubilidade de metais pesados que possam ser tóxicos à microbiota.

2.6.2.1.2 Bioestimulação

A bioestimulação é a adição de nutrientes a uma área poluída com o intuito de estimular o crescimento dos microrganismos, de ocorrência natural, degradadores dos compostos químicos presentes (MROZIK e SEGET, 2010). Esse processo é usado quando há a constatação de que existem microrganismos capazes de degradar compostos hidrocarbonados, no local da contaminação, e que estes não conseguem manter altas taxas de degradação devido a limitações físicas.

Ela concentra-se unicamente na microfauna existente, estimulando sua atividade pela manipulação das condições ambientais locais (EVANS e FURLONG, 2003). Algumas limitações naturais comuns à biodegradação de poluentes são os altos níveis de concentração de poluentes, falta de oxigênio, pH desfavorável, falta de nutrientes minerais, baixa umidade e temperaturas desfavoráveis. Uma variedade de métodos que modificam as condições ambientais podem ser utilizados para melhorar as taxas das atividades biodegradadoras da população microbiológica autóctone. Uma vez que as condições naturais limitantes são corrigidas, a distribuição natural existente de microrganismos permite, em muitos casos, um enriquecimento espontâneo de microrganismos apropriados (MARIANO, 2006).

Os microrganismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os hidrocarbonetos como fonte de alimento. Contudo, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação da população de microrganismos, causada pelo implemento dos níveis de nutrientes (SARKAR *et al.*, 2005).

2.6.2.1.3 Bioventilação

A técnica de bioventing, bioventilação ou bioaeração como é conhecida, caracteriza-se pela adição de oxigênio através do solo para estimular o crescimento dos organismos naturais e/ou introduzidos pela bioaumentação.

É uma tecnologia promissora que aumenta a biodegradação natural de hidrocarbonetos de petróleo mediante fornecimento de oxigênio aos microrganismos existentes no solo. Este processo utiliza baixas vazões de ar, suficientes apenas para manter a atividade microbiana. Na maioria dos casos, o oxigênio é fornecido pela injeção direta de ar na massa de solo contaminado. (MENEGETTI, 2007)

Quase todos os hidrocarbonetos de petróleo são biodegradáveis sob condições aeróbicas. O oxigênio é um co-substrato que pode iniciar o mecanismo de biodegradação e, depois de iniciado o metabolismo, pode também funcionar como aceptor de elétrons para a geração de energia. Em altas concentrações de hidrocarboneto, a biodegradação aeróbia pode não ser suficiente para degradá-los completamente. Quando o oxigênio é esgotado e o nitrato está presente, os microrganismos anaeróbios facultativos utilizarão o nitrato como aceptor final de elétrons em substituição ao oxigênio (BORDEN *et al.*, 1995).

A tecnologia de bioventilação é um importante meio de remoção, através de volatilização, da massa do contaminante e sua destruição *in situ*. A aplicação de ar e/ou oxigênio puro, a camada de subsuperfície, estimula o crescimento da população existente, resultando na redução, via potencial oxidativo da microbiota, dos contaminantes do sítio (FERNADES e ALCÂNTARA, 2003).

2.6.2.1.4 Bioaumentação

A bioaumentação diz respeito à inoculação do solo com culturas puras ou consórcio microbiano contendo microrganismos selecionados para degradação de contaminantes específicos. Estas adições podem ser como organismos endógenos inalterados, uma cultura seletivamente aclimatada às condições particulares a serem encontradas, ou geneticamente alteradas para adaptar-se as condições requeridas. Alguns métodos de remediação de solos simultaneamente bioestimulam a população

residente de bactérias e bioaugmentam o processo pela adição de fungos no solo sob tratamento (EVANS & FURLONG, 2003).

O processo de bioaumento envolve a introdução de micro-organismos que têm sido cultivados para degradar várias cadeias de hidrocarbonetos dentro de um sistema contaminado. As culturas podem ser derivadas de um solo contaminado ou obtidas de uma cultura estoque que tenha demonstrado, previamente, capacidade para degradar esses hidrocarbonetos (SARKAR *et al.*, 2005).

Alisi *et al.* (2009) trazem que a bioaugmentação tem diversas vantagens sobre outras técnicas, pois quando uma população microbiana é injetada, o processo de degradação pode começar imediatamente. Enquanto que na bioestimulação, por exemplo, envolve uma demora após a injeção dos nutrientes, pois conforme a população microbiana se propaga e caso os nutrientes não são específicos, todos os microrganismos irão se multiplicar potencialmente, diluindo o efeito dos nutrientes.

Conforme afirmam Mrozik e Seget (2010), a bioaugmentação parece ter um grande potencial para remediação de compostos aromáticos. O passo mais importante no sucesso da bioaugmentação é a seleção de cepas microbianas adequadas. A eliminação mais eficaz de contaminantes pode ser alcançada usando inóculos microbianos isolados em ambientes em que tenha ocorrido contaminação ao longo de várias décadas. O sucesso do bioaumento depende fortemente da capacidade dos inóculos para sobreviver no solo contaminado.

2.7 Derramamento de derivados do petróleo na água

Além do problema do descarte da água produzida, as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas por vazamento/derramamento de combustíveis vêm crescendo, sendo diversas as origens: acidentes envolvendo o transporte de combustíveis por navios, caminhões ou dutos e principalmente devido a vazamentos provenientes de tanques de armazenamento subterrâneos, os quais estão sujeitos a fortes processos corrosivos (SPILBORGHS, 1997).

Os postos de gasolina também compõem uma parte significativa do total dos empreendimentos, implantados nos centros urbanos, que representam potencialmente uma fonte de impacto ambiental caracterizada por vazamentos de derivados de petróleo

no solo. Os problemas gerados pela contaminação do solo e da água subterrânea por hidrocarbonetos são vários. Sanches (1998) aponta três problemas principais: existência de riscos à segurança das pessoas e das propriedades, riscos à saúde pública e dos ecossistemas e restrições ao desenvolvimento urbano e imobiliário. Segundo Gibotti (1999), a ocorrência de vazamentos de hidrocarbonetos configura perigo constante de incêndio ou explosão nos locais atingidos. Vapores de gasolina podem explodir sem ignição prévia ao atingirem concentrações da ordem de 14.000 ppm no ar, quando a mistura de combustível mais comburente é suficiente para que haja combustão espontânea. Além disso, alguns dos compostos orgânicos, como o BTEX, presentes na composição da gasolina e do óleo diesel são cientificamente comprovados como carcinogênicos (STOKSTAD, 2004).

No Brasil, postos de gasolina são responsáveis por mais da metade dos casos de contaminação do solo e aquíferos, em grande parte devido à falta de um acompanhamento eficaz e os longos tempos de vida dos tanques de armazenamento subterrâneo de aproximadamente 25 anos (BRITO *et al.*, 2010).

Do ponto de vista do derramamento de petróleo e derivados no solo, é relativamente comum a ocorrência de vazamentos em sistemas de armazenamento subterrâneos de combustível (em postos de gasolina, por exemplo). Infelizmente, na grande maioria dos casos, tanto contaminações superficiais provocadas junto a bombas e locais de enchimento dos reservatórios, bem como os vazamentos em tanques de armazenamento e tubulações subterrâneas, terminam, com frequência por atingir galerias de esgoto, redes de drenagem de águas pluviais, poços de abastecimento de água, etc. (BRITO *et al.*, 2010).

Outra problemática no que se refere à contaminação por compostos monoaromáticos, vem do fato que, no Brasil, adiciona etanol na gasolina em uma proporção de 20 a 26%, porém o comportamento físico e químico de seus compostos presentes é alterado por essa modificação. Assim, à medida que se aumenta a concentração do etanol adicionado à gasolina, pode acontecer um aumento de solubilidade dos hidrocarbonetos aromáticos em água (FENOTTI *et al.*, 2009).

2.8 Dinâmica dos compostos do óleo bruto

As características físico-químicas dos combustíveis determinam seu comportamento e de seus constituintes no ambiente, ou seja, a mobilidade dos combustíveis é influenciada pelas propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos presentes, dentre as quais, as mais importantes são: solubilidade, pressão de vapor, densidade, viscosidade e o coeficiente de partição octanol-água. Este coeficiente é definido como a razão da concentração de um composto orgânico dissolvido entre o octanol e a água, em equilíbrio, o qual descreve a tendência de participação de um composto entre a fase orgânica e a fase aquosa. Assim, quanto maior for esta razão, maior será a hidrofobicidade do composto. (TROVÃO, 2006).

O escoamento dos hidrocarbonetos em meio saturado sempre é bifásico por serem compostos orgânicos que apresentam baixa miscibilidade em água. A fase composta pelos hidrocarbonetos recebe a denominação de NAPL (non-aqueous phase liquid) ou fase líquida não aquosa. Esta, por sua vez, se divide em duas outras fases de acordo com a densidade dos hidrocarbonetos, são elas: LNAPL - light non-aqueous phase liquid, ou fase líquida não aquosa mais leve que a água, que compreende os hidrocarbonetos associados com a produção, refino e distribuição de produtos do petróleo, por exemplo, a gasolina, o óleo diesel e o querosene; e DNAPL - dense non-aqueous phase liquid ou fase líquida não aquosa mais densa que a água, a qual corresponde aos hidrocarbonetos utilizados nas atividades industriais, como hidrocarbonetos clorados, PCBs (bifenilas policloradas), antraceno, pireno entre outros (GUIGUER, 2000 apud MARIANO, 2006).

Nos casos de derramamentos em solo, primeiramente os combustíveis (LNAPL) tendem a migrar verticalmente, infiltrando no solo chamado de zona não saturada, até atingir o lençol freático, denominado de zona saturada (FERREIRA, 2000). Conforme Guiguer (2000) apud Mariano (2006), esta infiltração é caracterizada pela formação de quatro fases distintas que regulam o processo de migração dos contaminantes: fase líquida residual, fase líquida livre, fase dissolvida e fase vapor. A formação das fases é controlada basicamente pelos fenômenos de dissolução, volatilização e adsorção. A fase líquida residual pode existir no solo como resíduos líquidos relativamente imóveis, adsorvidos ou retidos entre os sólidos do solo. O líquido livre não residual que passa pelo solo é chamado de fase líquida livre, que ao atingir o nível d'água subterrânea passa a flutuar sobre o mesmo. Já os hidrocarbonetos em fase

dissolvida podem formar películas sobre a superfície do solo, ou mesmo plumas de contaminação quando atingem o nível d'água subterrânea. Porém, os hidrocarbonetos em fase de vapor podem ser volatilizados pelo vapor do solo, podendo também se condensar e adsorver-se na superfície sólida ou dissolver-se na água do solo.

Segundo Ferreira (2000), a água de infiltração dissolve os componentes solúveis, como BTEX, pertencentes à LNAPL, e os transportam até a zona saturada, na forma de uma pluma que se distribui por difusão. Muitas das substâncias tendem a volatilizar, assim, o gás sofre partição de modo que uma parte fica retida no solo e outra migra para o ar, sendo transportados para outras partes do aquífero por difusão molecular. Os voláteis movem-se primeiramente pela zona saturada e finalmente entram na camada superficial do solo, onde, dependendo das condições físico-químicas retornam para a fase líquida por condensação.

Diferentemente dos compostos LNAPL, os DNAPL tendem a ocupar a parte mais profunda dos aquíferos quando o derrame é suficientemente grande. No entanto, muitas substâncias decaem rapidamente ou são imobilizadas no solo de maneira que o número de compostos com persistência e mobilidade suficientes para deslocar-se até o lençol freático e contaminar as águas subterrâneas é relativamente pequeno (CETESB, 2008). Além de tóxicos os DNAPLs são muito difíceis de remediar com técnicas de remediação mais usuais.

Como os hidrocarbonetos usualmente se agregam aos componentes do solo, isto passa a ser um fator limitante a biodegradação dos poluentes. O processo de biorremediação depende da capacidade de assimilação dos compostos pelos microrganismos, e se estes passam a ter disponibilidade limitada, ocorrerá dificuldade na sua degradação. Desta forma, há a necessidade da utilização de substâncias que aumentem a disponibilidade desses poluentes à população microbiana, os surfactantes que tem a capacidade de reduzir a tensão superficial água/óleo aumentando sua solubilidade.

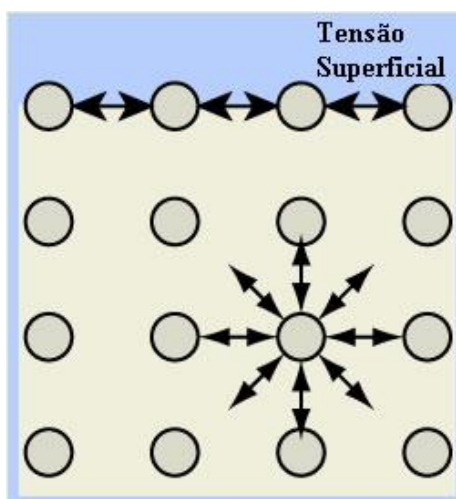
2.9 Tensão superficial

A tensão superficial diz respeito às forças coesivas entre as moléculas de um líquido, pois estes tendem a adotar uma forma que minimize sua área de superfície, na tentativa de manter as moléculas com um maior número possível de vizinhos

semelhantes. As moléculas na superfície não têm outras moléculas iguais na sua vizinhança e, conseqüentemente, sofrem uma coesão mais forte com aquelas diretamente associadas.

As forças coesivas entre as moléculas no interior do líquido são compartilhadas com os átomos vizinhos. Aquelas da superfície não têm átomos vizinhos acima delas, e exibem uma força atrativa mais forte sobre suas vizinhas mais próximas na superfície. Este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície é chamado de tensão superficial, como pode ser observado no esquema ilustrativo na Figura 9.

Figura 9: Esquema ilustrativo das forças intermoleculares.



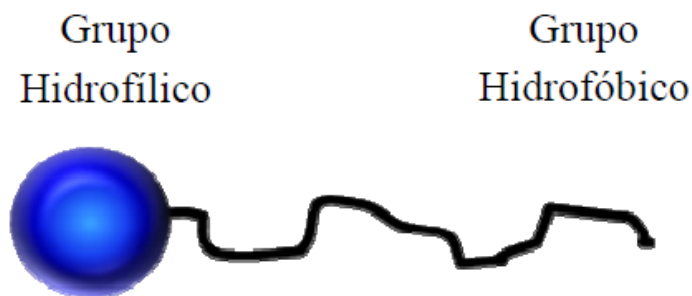
FONTE: FOGAÇA, 2015.

2.10 Surfactantes

Os surfactantes são compostos formados por moléculas que possuem uma parte hidrofóbica (região apolar) e uma hidrofílica (região polar), como pode ser visto na Figura 10, que tendem à separação preferencialmente na interface entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, tais como interfases óleo/água ou ar/água. Atuam nas tensões superficial e interfacial e formam microemulsões onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água e vice versa. A eficácia dos surfactantes é determinada através da capacidade de reduzir a tensão superficial, que é a medida de energia livre por unidade de área, necessária para trazer

uma molécula do interior do líquido para a superfície (ROSEN, 1978 apud MULLIGAN, 2005).

Figura 10: Ilustração de um monômero de tensoativo.



FONTE: SILVA, 2010.

Desta forma, os surfactantes são uma ampla classe de moléculas anfipáticas (com domínio polar e apolar) que apresentam uma grande variedade de aplicações, tanto industriais como na limpeza de locais contaminados com hidrocarbonetos. Contudo, surfactantes sintéticos mostram alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e eficiência somente em faixas pequenas de pH e temperatura.

2.11 Biosurfactante

Devido às limitações dos surfactantes sintéticos, o interesse pelos biosurfactantes (surfactantes de origem microbiana), produzidos por certas bactérias, leveduras e fungos, tem aumentado devido à baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficiência em valores de temperatura, pH e salinidade extremos e seu papel na recuperação de ecossistemas pela aceleração da biodegradação dos hidrocarbonetos provenientes de vazamentos. Além disso, alguns biosurfactantes apresentam capacidades anti-fúngicas, anti-virais e de sorção de metais e são usados na indústria do petróleo para aumentar a recuperação do petróleo (OLIVEIRA *et al.*, 2005; PRUTHI e CAMEOTRA, 1997).

Os biosurfactantes apresentam as mesmas características dos surfactantes químicos, isto é, reduzem as tensões interfacial e superficial, tanto em soluções aquosas quanto em misturas de hidrocarbonetos. Possuem uma estrutura comum, cuja porção

hidrofílica pode ser composta de aminoácidos ou peptídeos, mono, di ou polissacarídeos, enquanto a porção hidrofóbica é constituída de uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, saturados ou insaturados (DESAI e BANAT, 1997).

São muitas as vantagens apresentadas pelo biossurfactante quando comparado aos de origem sintética, tais como (KOSARIC, 2001):

- Alta biodegradabilidade;
- Baixa toxicidade;
- Biocompatibilidade e biodigestividade, que permitem suas aplicações em cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos em alimentos;
- Possibilidade de produção a partir de fontes de baixo custo e resíduos industriais;
- Especificidade de aplicações, já que são moléculas orgânicas complexas, com grupos funcionais específicos;
- Uso em biorremediação de locais impactados por óleo e biodegradação e detoxificação de efluentes industriais;
- Eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade.

Os biossurfactantes, ao serem excretados durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e a translocação de substratos insolúveis através da membrana celular. Estes biotensioativos podem ser encontrados como moléculas intracelulares, serem secretados pelas células microbianas, ou ficarem aderidos à superfície dessas células com a função de facilitar a entrada de compostos pela membrana celular ou para aumentar a biodisponibilidade das substâncias hidrofóbicas (MARIANO *et al.*, 2006; CAMEOTRA & SINGH, 2009).

2.12 Principais biossurfactantes e microrganismos produtores

Enquanto os surfactantes químicos são classificados de acordo com a natureza de seu grupo polar, os biossurfactantes são classificados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes incluem: glicolipídeos, fosfolipídeos, lipopeptídeos ou lipoproteínas (DESAI e DESAI, 1993).

Essas classes e seus microrganismos produtores correspondente estão distribuídos entre uma extensa variedade de gêneros, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídeos	
• Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
• Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola, T. apícola</i>
• Trealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium SP</i>
Lipopeptídeos e Lipoproteínas	
• peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
• viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
• serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
• surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
• subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
• gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
• polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, Lipídeos neutros e Fosfolipídeos	
• ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
• lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
• fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
• emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
• biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
• liposan	<i>Candida lipolytica</i>
• carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
• manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
• vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
• células	Várias bactérias

FONTE: DESAI e BANAT (1997)

Dentre esses, os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas spp.* são extensamente estudados.

2.13 *Pseudomonas aeruginosa*

Dentre todos os grupos de organismos, as bactérias desempenham o papel mais importante na biorremediação de solos e águas subterrâneas. O gênero mais comum de bactérias que se encontram no solo são: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Vibrio* e *Flavobacterium*. Dentre estes, o gênero *Pseudomonas*, que engloba uma diversidade de espécies que partilham uma elevada versatilidade metabólica, ocorre com extrema frequência em solos e processos de tratamento biológicos.

A *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria gram-negativa, pode ser isolada de diferentes habitats incluindo a água, o solo e plantas, é um patógeno oportunista humano que causa infecções nosocomial sérias e também é resistente a antibióticos. Sob condições ambientais específicas esta bactéria produz um biossurfactante contendo o glicolípido ramnose. O tipo e a proporção do ramnolípido produzido dependem da cepa, da fonte de carbono utilizada e das condições de cultivo. (FONTES *et al.*, 2008)

A cultura de *Pseudomonas* produz primeiramente duas formas de ramnolídeos: ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (mono-ramnolípido) e L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (di-ramnolípido) (Sánchez *et al.*, 2007).

2.14 Ramnolídeos

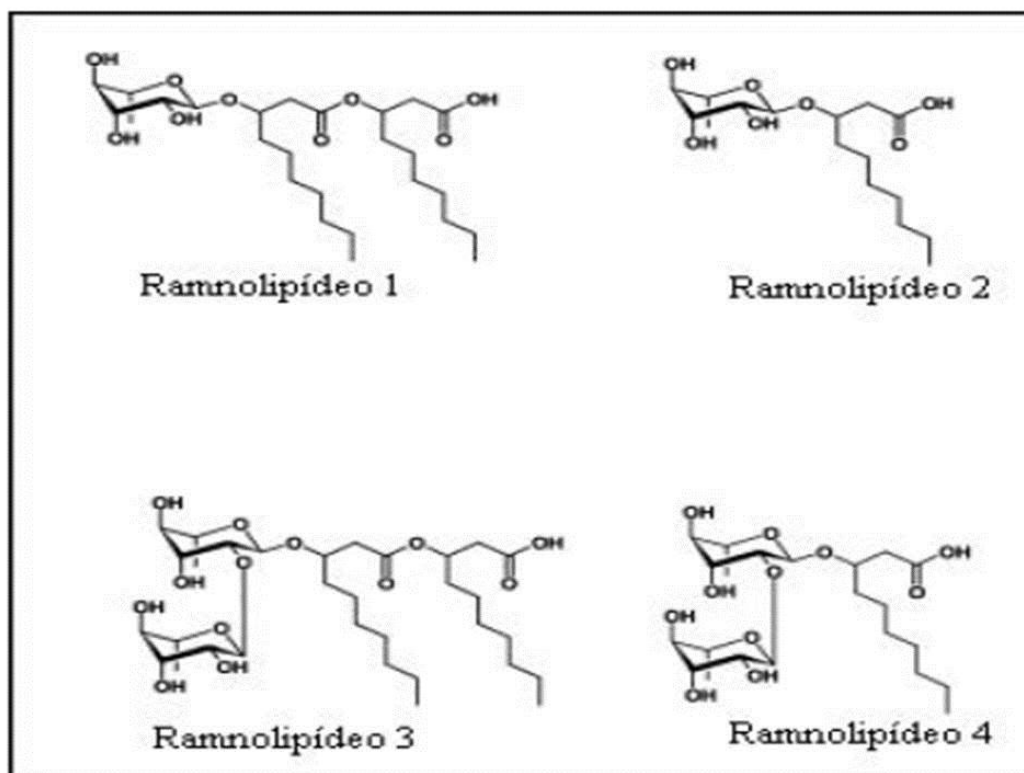
Os ramnolídeos constituem uma das classes mais interessantes dos biossurfactantes por causa de suas características vantajosas. Com respeito a sua produção, mostram rendimentos elevados em comparação a outros biossurfactantes, bem como diversos materiais renováveis, tais como óleos ou resíduos da indústria de alimento, podem ser usados como fontes do carbono (Sánchez *et al.*, 2007).

Diferentes tipos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produzem diversos homólogos estruturais de ramnolídeos. O tipo produzido depende da cepa bacteriana, da fonte do carbono usada, e da estratégia do processo (Lang & Wullbrandt, 1999).

Os principais glicolídeos produzidos por *P. aeruginosa* são os ramnolídeos dos tipos 1 e 2, L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, respectivamente. A

formação de ramnolipídeos 3 e 4, contendo uma molécula de ácido β -hidroxidecanóico e uma ou duas unidades de ramnose, respectivamente, metil-ésteres derivados dos ramnolipídeos 1 e 2 e ramnolipídeos com outras cadeias de ácidos graxos também já foram previamente reportadas (Kronemberger *et al.*, 2007). Na Figura 11, pode ser observado as estruturas dos 4 tipos de ramnolipídeos.

Figura 11: Estrutura dos ramnolipídeos 1-4



FONTE: TUMMELER, EFFENBERGER E SYLDATK (2003)

Os ramnolipídeos consistem de uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas cadeias de ácido graxo, com 8-12 átomos de carbono, que podem ser saturados ou insaturados (SIM *et al.*, 1997).

2.15 Modelos cinéticos de crescimento microbiano

O conhecimento da cinética de crescimento microbiano em compostos tóxicos e das relações entre múltiplos substratos presentes no meio são fundamentais para a otimização e alcance de processos mais eficientes.

Assim, a modelagem da cinética de biodegradação destes compostos possibilita o estudo da influência dos parâmetros do processo no crescimento da biomassa e consumo dos substratos, além da formação de produtos, sendo importante para a compreensão da fisiologia microbiana, bem como mecanismos de controle interno.

A modelagem cinética utilizando modelos para um único substrato, como os clássicos modelos de Monod e Andrews (SEGEL, 1975; YOON et al., 1977), parte da hipótese de que os dados experimentais são baseados somente na fisiologia microbiana, e apesar de serem inadequados para descrever os mecanismos complexos de regulação interna, são fundamentais para o entendimento da cinética no nível da população microbiana.

2.15.1 Modelo de Monod

Monod admite que todos os componentes do meio de cultura, menos um, estão presentes em altas concentrações balanceadas, tal que mudanças nestas condições não afetam significativamente a taxa de crescimento celular. Assim, um simples componente torna-se limitante (substrato), e somente as variações na concentração deste componente causariam alterações no comportamento do meio de cultura (BAILEY & OLLIS, 1986).

A equação de Monod relaciona a taxa de crescimento em função da concentração do substrato. A constante de Monod K_s , denominada constante de saturação, representa o valor da concentração de substrato S no qual a taxa de crescimento específico é igual à metade do seu valor máximo, e indica especialmente a afinidade do microrganismo ao substrato (SCHIMIDELL *et al*, 2001).

Para um cultivo em batelada, que é caracterizado pela vazão volumétrica nula, o balanço de massa para a biomassa, para o substrato e o produto pode ser expresso pelas Equações 1, 2 e 3, respectivamente:

$$\frac{dX(t)}{dt} = \frac{\mu_{m\acute{a}x} * S(t)}{K_s + S(t)} * X(t) \quad (1)$$

$$\frac{dS(t)}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} * \frac{\mu_{m\acute{a}x} * S(t)}{K_s + S(t)} * X(t) \quad (2)$$

$$\frac{dP(t)}{dt} = Y_{p/x} * \frac{\mu_{m\acute{a}x} * S(t)}{K_s + S(t)} * X(t) \quad (3)$$

2.15.2 Modelo de Andrews

O modelo de Andrews segue as mesmas suposições do modelo de Monod e também, conforme SHALABY (2003), é baseado na taxa de crescimento específico (ALLSOP et al., 1993). Porém este possui a capacidade de expressar a inibição pelo substrato.

Assim, para um cultivo em batelada, o balanço de massa para a biomassa, para o substrato e o produto pode ser expresso pelas Equações 4, 5 e 6, respectivamente:

$$\frac{dX(t)}{dt} = \frac{\mu_{m\acute{a}x} * S(t)}{K_s + S(t) + \frac{S(t)^2}{K_I}} * X(t) \quad (4)$$

$$\frac{dS(t)}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} * \frac{\mu_{m\acute{a}x} * S(t)}{K_s + S(t) + \frac{S(t)^2}{K_I}} * X(t) \quad (5)$$

$$\frac{dP(t)}{dt} = Y_{p/x} * \frac{\mu_{m\acute{a}x} * S(t)}{K_s + S(t) + \frac{S(t)^2}{K_I}} * X(t) \quad (6)$$

CAPÍTULO 3

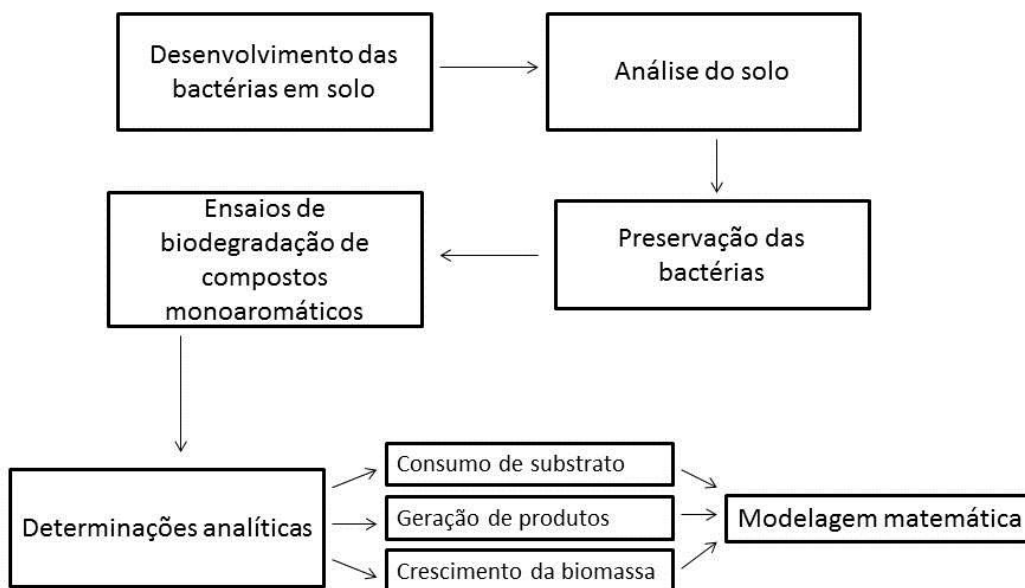
METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

Neste capítulo serão apresentadas as técnicas e os materiais utilizados para a realização de cada etapa do estudo. Inicialmente será apresentado o processo utilizado para o desenvolvimento e preservação das bactérias. Em seguida, a explicação de como foi realizado o ensaio para determinação do crescimento e produção de biossurfactante, além da taxa de biorremediação de águas contaminadas com compostos monoaromáticos (BTEX). Todas as técnicas descritas foram realizadas no Núcleo de Petróleo e Gás Natural (NUPEG) e no Laboratório de Engenharia Ambiental e Controle de Qualidade (LEACQ – DEQ/UFRN).

A Figura 12 abaixo mostra o fluxograma simplificado das etapas realizadas no estudo.

Figura 12: Fluxograma experimental.



3.1 Desenvolvimento das bactérias em solo

Sabendo que o solo é um dos habitats naturais de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizou-se 1,5 kg de areia com diâmetro entre 0,8 e 1,2 mm, a qual foi acondicionada em bandejas plásticas, como mostrado na Figura 13, e enriquecida com uma solução petróleo/diesel de 2,5 g/L, de modo que ficassem com uma concentração de 2% v/m. O solo também foi umedecido com uma solução nutritiva com a seguinte composição: KH_2PO_4 0,5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L; CaCl_2 0,01 g/L; NaNO_3 7,0 g/L; KCl 0,1 g/L; K_2HPO_4 1,0 g/L e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L também foi utilizada uma concentração de 2% v/m.

Figura 13: Solo contaminado para o desenvolvimento das bactérias.



Durante 25 dias foi promovido, em intervalos regulares de cinco dias, a aeração e a exposição ao sol das bandejas que continham o solo. Nesse período, também eram recolhidas amostras que foram submetidas a análises bacteriológicas para identificação e quantificação da espécie *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2 Análise do solo para identificação e quantificação das bactérias

Utilizando erlenmeyers de 125 mL, amostras de 1 g de areia foram diluídas em 100 mL de água destilada. Esse sistema foi submetido à agitação de 200 rpm por 24 horas para que houvesse o máximo de contato do solo com a água, possibilitando, assim, a transferência dos microrganismos para a água. O mecanismo utilizado pode ser observado na Figura 14 abaixo.

Figura 14: Mecanismo para transferência das bactérias da areia para água.



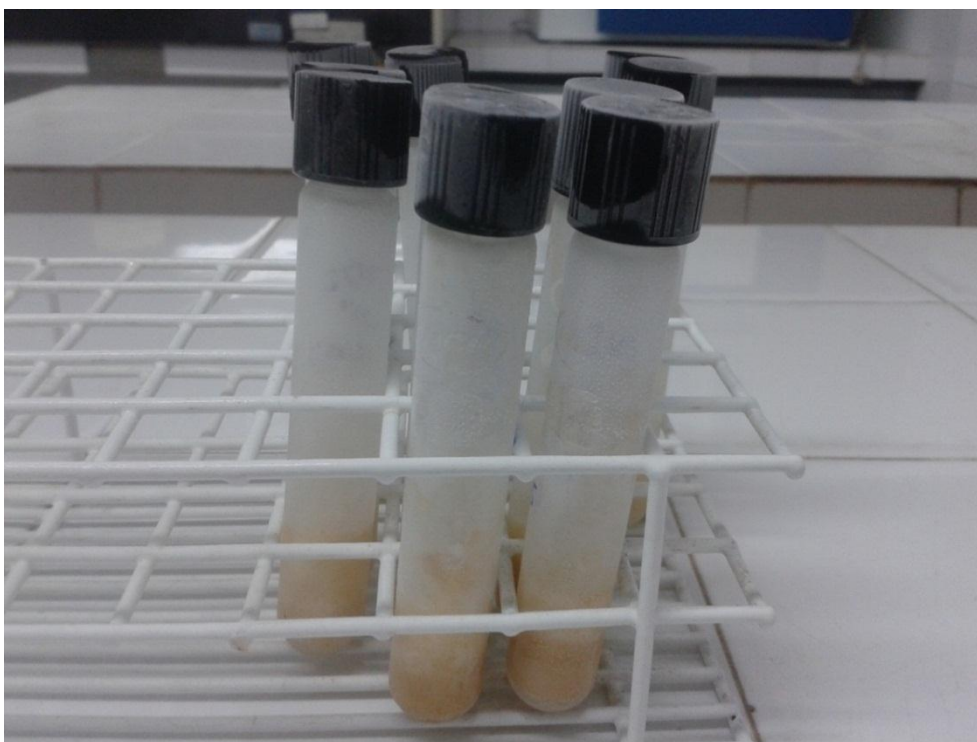
Após as 24 horas realizaram-se diluições em série das amostras, de modo a permitir a inoculação no meio qualitativo Acetamide Agar e no quantitativo Cetrimide Agar, ambos meios seletivos para as *Pseudomonas aeruginosas*. Os inóculos permaneceram por dois dias em uma estufa regulada em 35 °C, conforme especificações do meio.

Posteriormente foi realizada a contagem das colônias que se desenvolveram durante o período de inoculação.

3.3 Preservação das bactérias

As colônias que se desenvolveram, após serem quantificadas, foram repicadas e transferidas para o meio skin milk (JALILI, 2010), concentração de 15% em massa, como mostrado na Figura 15, onde foram preservadas a uma temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ de modo a permitir sua posterior utilização.

Figura 15: *Pseudomonas aeruginosas* preservadas em skin milk.



3.4 Desenvolvimento das bactérias preservadas

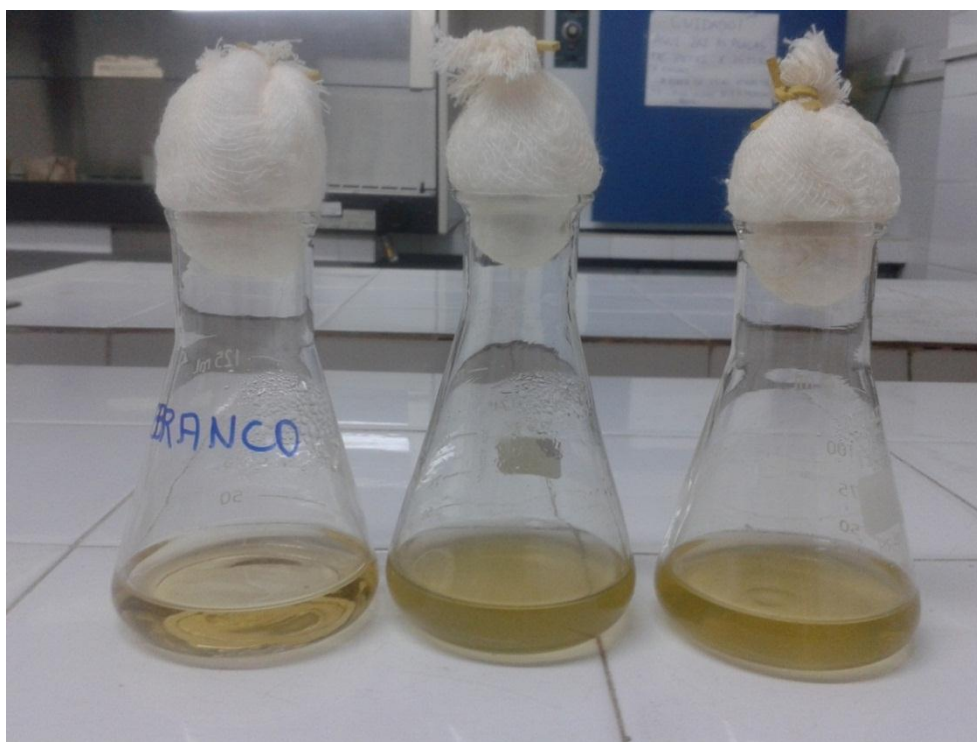
As bactérias que mostraram melhor adaptação ao solo contaminado com óleo bruto foram utilizadas para a análise do seu crescimento e da produção do biossurfactante.

Desta forma, as bactérias presentes no skin milk foram transferidas para placas petri contendo o meio nutriente Count Plante Agar e colocadas na estufa regulada com uma temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas, conforme especificações do meio, para o seu completo desenvolvimento.

3.5 Ensaio de biodegradação de compostos monoaromáticos

As colônias desenvolvidas foram repicadas e transferidas para um pré-inóculo com uma solução nutritiva de peptona 2% em massa, onde permaneceram no shaker em agitação de 200 rpm e 30 °C durante 10 horas (MIGUEZ, 2012). Após essa etapa, as bactérias já estavam preparadas para os ensaios. A Figura 16 abaixo mostra a mudança de cor da solução inicial, indicando a produção de biomassa.

Figura 16: Solução de peptona após 10 horas de incubação.



Utilizou-se como meio líquido para a avaliação da produção de biossurfactante, do crescimento celular e consumo do substrato, o meio mineral descrito por Robert *et al.*, 1989, cuja composição pode ser encontrada na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5: Composição do meio mineral.

Composto	Concentração (g/L)
NaNO ₃	7,0
KCl	0,1
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0
CaCl ₂	0,01
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01

Após ajuste de pH para 7,0 com NaOH ou HCL 1N, quando necessário, o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 15 minutos.

Nos ensaios, empregou-se o composto monoaromático a ser testado com concentrações variando de 40 a 200 ppm, dependendo do composto. Esta faixa foi escolhida de acordo com a solubilidade de cada composto e dos valores das concentrações dessas substâncias em vazamentos, de acordo com Fernandes (1997). Todos os experimentos foram incubados em mesa agitadora, a 20°C e 200 rpm. Os testes foram realizados em erlenmeyers de 125 mL, contendo um volume final de 50 mL de meio de cultivo. Os recipientes foram inoculados com 2% da suspensão celular das *Pseudomonas*, obtida do cultivo da solução de peptona, e mantidos durante 3 horas no shaker, como mostrado na Figura 17.

Figura 17: Testes de biodegradação.



As amostras foram retiradas a cada 15 minutos, para análise de crescimento celular, produção de ramnose e consumo de carbono.

3.6 Determinações analíticas

3.6.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada através da massa seca pelo método descrito por Vitolo (1995). Para tanto, amostras do meio fermentado foram filtradas através de uma membrana previamente tarada, seguida da introdução do sistema (membrana + células) em estufa a 105°C. Após 2 horas de secagem, a membrana era acondicionada em um dessecador com sílica gel até resfriar e, só então, a membrana com a massa celular seca era pesada. A determinação da massa seca foi feita pela diferença dos pesos final e inicial das membranas.

As membranas utilizadas para a execução dessa análise foram as membranas de ultrafiltração de diâmetro de poro de 0,45 µm e marca MILLIPORE®.

3.6.2 Determinação da concentração de biosurfactante

A produção do ramnolipídeo foi quantificada colorimetricamente em termos de concentração de ramnose produzida no meio de cultivo, através da análise de 6-deoxihexose (CHANDRASEKARAM e BEMILLER, 1980).

Preparo dos reagentes:

Solução A:

- 90 mL de H₂SO₄
- 15 mL de água destilada

Esta solução pode ser preparada anteriormente e estocada em frasco âmbar.

Solução B:

- 0,2 mL de ácido tioglicólico
- 5,8 mL de água destilada

Esta solução deve ser preparada apenas no momento de uso.

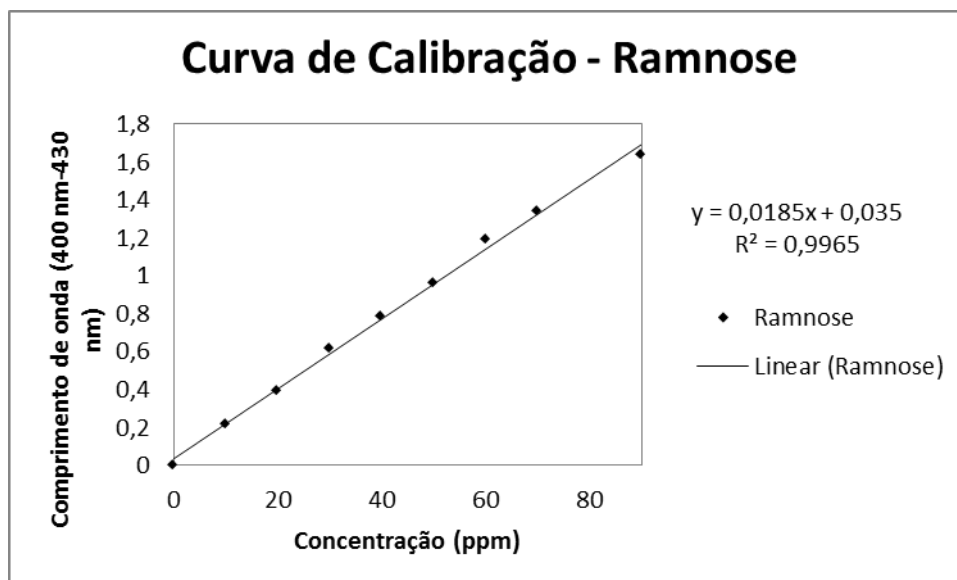
O procedimento consiste em, no tubo de ensaio, adicionar 1mL da amostra contendo ramnose juntamente com 4,5 mL da solução A e incubar por 10 minutos a 100°C. Após a solução ter resfriado a temperatura ambiente, adicionar 0,1 mL da solução B, homogeneizar os tubos e guardar em local com ausência de luz por três horas. Passado esse tempo, deve-se realizar a leitura de absorbância a $\lambda=400$ nm e $\lambda=430$ nm no espectrofotômetro UV visível.

Antes de realizar a leitura das amostras, foi preparada uma curva padrão de ramnose, a partir de uma solução inicial de ramnose comercial 100 mg/L. Esta solução foi diluída em concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 90 mg/L. Aplicou-se o procedimento citado acima para cada uma das diluições e foi realizada a leitura da absorbância ($\lambda=400$ nm e $\lambda=430$ nm) das mesmas. A leitura em $\lambda=430$ nm indica a interferência de outros açúcares.

Com os resultados, subtraiu-se o valor obtido na leitura a $\lambda=430$ nm do obtido na leitura a $\lambda=400$ nm, para se obter o valor da absorbância final. A Figura 18 abaixo apresenta a curva padrão de ramnose, a partir da qual se obteve a seguinte expressão:

$$[] \text{ de ramnose} = \left(\frac{\text{Absorbância final} - 0,0355}{0,0185} \right) * \text{fator de diluição}$$

Figura 18: Curva de calibração da Ramnose.



Para a determinação da concentração de ramnose das amostras retiradas, foi utilizado o sobrenadante livre de células para realizar o mesmo procedimento citado

anteriormente. A equação foi utilizada para a conversão dos dados de absorvância à concentração equivalente.

3.6.3 Determinação da concentração de monoaromáticos

A determinação do consumo do substrato foi determinada por cromatografia líquida. Para tanto foi utilizada uma coluna C18 HPLC column Varian de 15 centímetros de comprimento e 4,6 milímetros de diâmetro interno, com uma solução de 70% de acetonitrila e 30% de água em volume, a uma vazão de 1 mL/min, e injetando 50 microlitros da amostra.

3.7 Procedimento para a identificação dos parâmetros cinéticos

Para a estimativa inicial dos parâmetros foi utilizada uma técnica conceitual simples, que pode ser obtida através de duas regressões lineares. A primeira, como observado na figura 7 abaixo, correlaciona o inverso da velocidade específica de crescimento ($1/\mu_x$) com o inverso da concentração de substrato ($1/S$), conhecido como o gráfico de Lineweaver-Burk, onde o coeficiente angular é igual a (K_s/μ_m) e o coeficiente linear a $(1/\mu_m)$. A segunda regressão linear correlaciona os dados do crescimento celular em relação ao consumo do substrato para diferentes intervalos de tempo. O coeficiente angular dessa correlação é igual ao parâmetro $Y_{X/S}$ (SCHIMIDELL *et al*, 2001).

$$\frac{1}{\mu_x} = \frac{1}{\mu_{máx}} + \frac{K_s}{\mu_{máx}} * S(t) \quad (7)$$

A partir dos valores iniciais, os valores do modelo de acordo com Monod e Andrews foram determinados utilizando o método de Runge-Kutta quarta ordem. A avaliação da eficiência dos modelos é feita por meio do valor mínimo da função objetivo global, dada pelos mínimos quadrados. Para as variáveis substrato (S), biomassa (X), o cálculo da função objetivo é dado pelas Equações 8, 9 e 10, respectivamente :

$$R = \sum_i \left(\frac{S_i^{cal}}{S^{max}} - \frac{S_i}{S^{max}} \right)^2 \quad (8)$$

$$R = \sum_i \left(\frac{X_i^{cal}}{X^{max}} - \frac{X_i}{X^{max}} \right)^2 \quad (9)$$

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

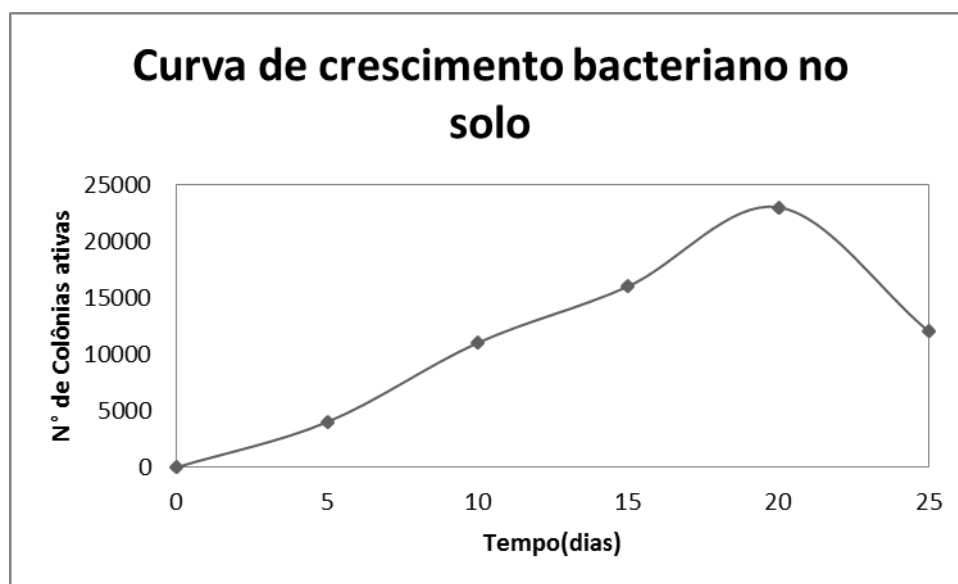
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são discutidos os resultados obtidos por cada uma das técnicas aplicadas na pesquisa. Inicialmente serão apresentados os resultados para o desenvolvimento das bactérias do tipo *Pseudomonas aeruginosa* no solo, em seguida os resultados para os ensaios em meio líquido para os testes de biorremediação de compostos monoaromáticos, juntamente com os resultados obtidos dos parâmetros cinéticos a partir dos modelos de Monod e Andrews.

4.1 Resultado do desenvolvimento das bactérias em solo

Durante 25 dias foi analisada, tanto quantitativamente como qualitativamente, a presença de bactérias do tipo *Pseudomonas aeruginosa* em solo manualmente contaminado. O resultado pode ser observado na Figura 19 abaixo.

Figura 19: Quantificação das bactérias em solo.



Pode-se observar que ocorreu um crescimento da quantidade de colônias ativas até o vigésimo dia. Portanto, apenas durante o período de desenvolvimento das bactérias é que as colônias foram repicadas e preservadas em meio skin milk.

4.2 Teste de biorremediação para compostos monoaromáticos

A seguir são mostrados os resultados obtidos nos testes de biorremediação, utilizando como fonte de carbono compostos monoaromáticos solúveis em água, ou seja, benzeno, tolueno e etilbenzeno. Estes ensaios tiveram como objetivo avaliar o crescimento microbiano, a produção de biossurfactante e o consumo de carbono.

Para cada composto, o teste foi realizado em cinco concentrações distintas, visando descobrir a cinética de crescimento e o comportamento da bactéria para baixas e altas concentrações da fonte de carbono. Em todos os ensaios, a inoculação foi realizada no meio de cultura favorável ao desenvolvimento das *Pseudomonas aeruginosas*, sob temperatura controlada e agitação adequada.

4.2.1 Tolueno

Os resultados dos experimentos obtidos nos testes de biorremediação para o tolueno podem ser observados nas Figuras 20 e 21, abaixo, onde estão representados tanto os valores experimentais do consumo do substrato (S) quanto de crescimento da biomassa (X) ao longo do tempo (h), respectivamente.

Figura 20: Consumo de substrato em relação ao tempo.

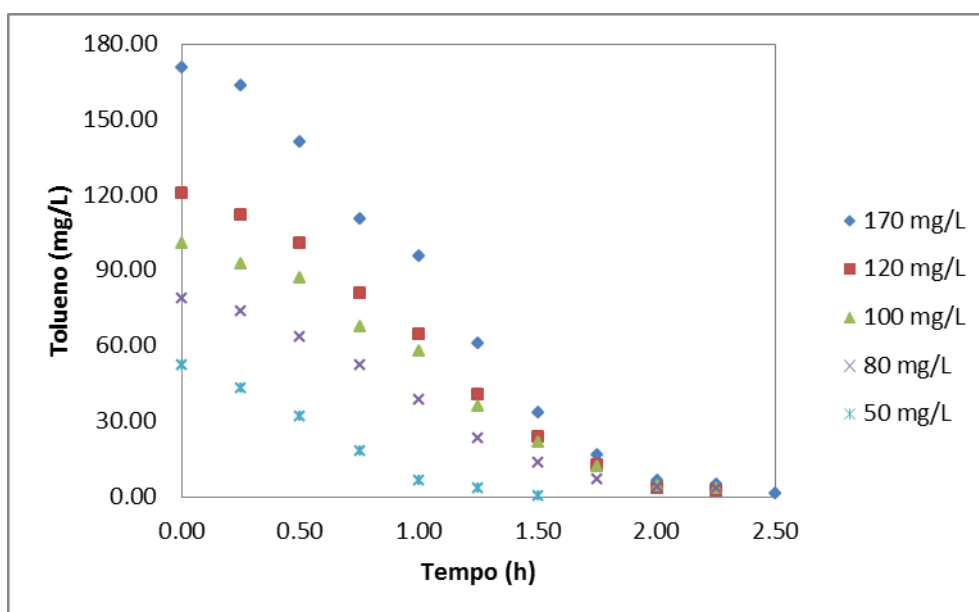
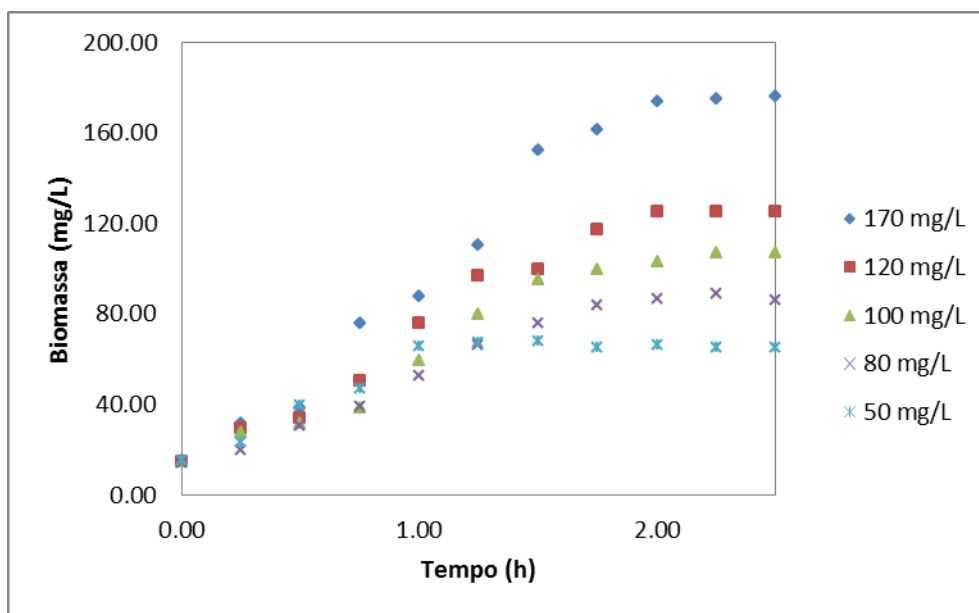


Figura 21: Crescimento da biomassa em relação ao tempo.



É possível verificar que as curvas de consumo de substrato apresentam conformação semelhante e após 2 horas quase todas apresentaram um valor próximo à zero. Sendo que para maior concentração, de 170 mg/L, no tempo de 1,5 horas, o consumo de substrato já era superior a 80 %. Drakou et. al, 2015, conseguiram uma remoção próxima de 100% de tolueno apenas em 24 h e para uma condição de alta salinidade, 20 g/L de NaCl. EL-Naas *et al.* (2014), em seu artigo sobre biodegradação dos BTEX, fizeram uma compilação de resultados de remoção de tolueno em diferentes meios de cultivo e para diferentes microrganismos. Os autores apresentaram remoções acima de 80 % mas sempre para tempo de reação a partir de 24 horas.

Nas curvas de crescimento de biomassa, foi possível verificar que nenhuma apresentou uma fase *lag* de crescimento, o que evidencia que não foi necessário um período de adaptação ao substrato e uma boa realização do pré-inóculo. Isso pode ser comprovado ao plotar a curva de $\ln X$ versus o tempo, o que indicou o início da fase exponencial de crescimento nos instantes iniciais de cultivo. Também foi possível observar que, com a redução da disponibilidade de carbono, ocorreu uma redução na taxa de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa*, esse fato também pode ser observado no estudo realizado por Drakou *et al* (2015) e Malhoutier *et al* (2014).

As tabelas contendo os dados experimentais e o valor do desvio padrão em cada medida pode ser observado no Anexo I. O baixo valor do desvio padrão mostra que o processo de mensuração utilizado obteve uma boa precisão.

Com base nesses resultados foram obtidos os parâmetros cinéticos do modelo de Monod, obtidos com a modelagem pelo método de Runge-Kutta quarta ordem, que encontram-se expressos na Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros cinéticos para o modelo de Monod.

Parâmetros	50-170 mg/L
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	1,72
K_s (mg/L)	16,53
$Y_{x/s}$ (mg/mg)	0,84

Os gráficos que representam em conjunto os dados experimentais e os dados calculados podem ser observados abaixo. O baixo valor das funções objetivo mostra uma boa acurácia dos valores calculados.

Figura 22: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o consumo de tolueno.

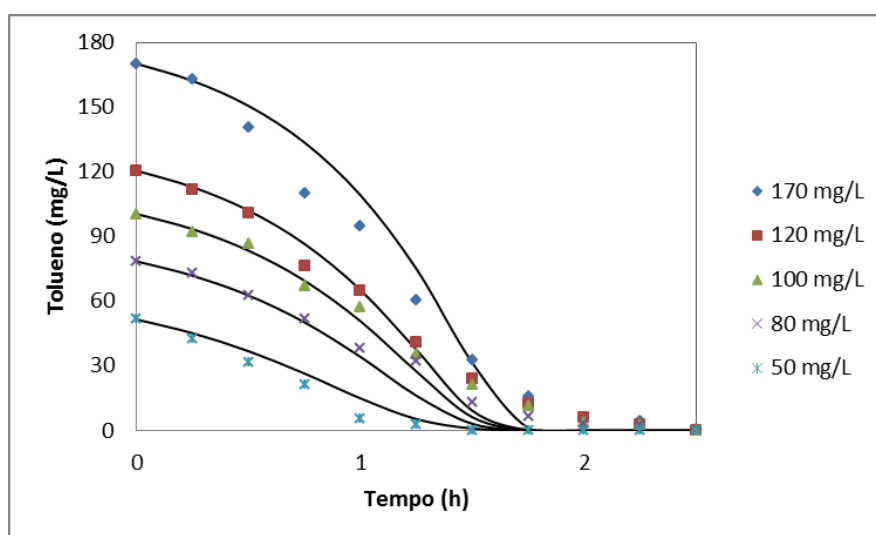
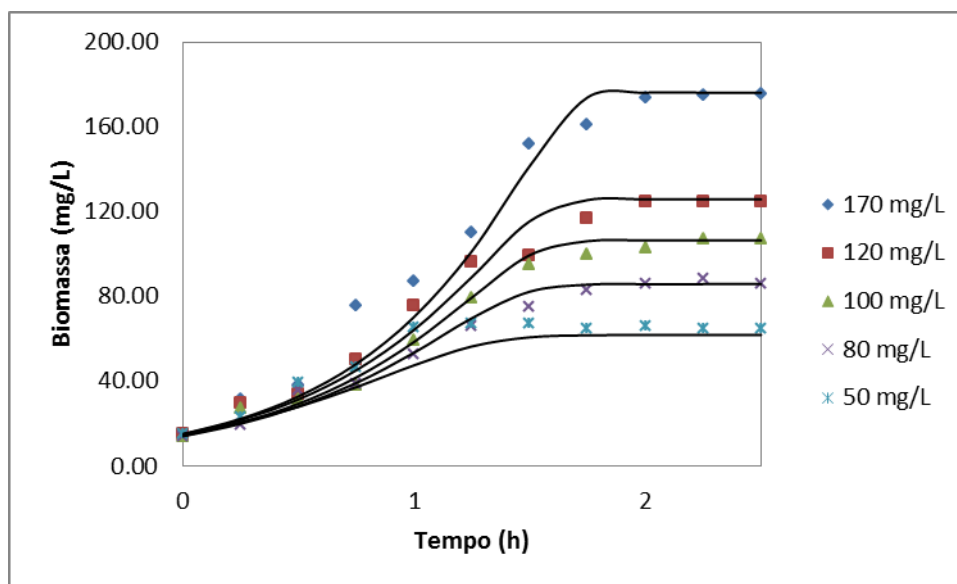


Figura 23: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o crescimento da biomassa.



O valor de $\mu_{\text{máx}}$ mostrou-se condizente com outros estudos realizados para diferentes tipos de *Pseudomonas*: 0.17 h^{-1} para *Pseudomonas putita* (Mathur, 2010), 0.42 h^{-1} para *Pseudomonas putita* 54G (Mirpuri, 1997), 1.56 h^{-1} para *Pseudomonas putita* OI (OH *et al.*, 1994) e 0.78 h^{-1} para *Pseudomonas putita* F1 (Bordel, 2007).

A constante de saturação (K_s), que é definida como a concentração do substrato no qual μ_x é igual à metade de $\mu_{\text{máx}}$, também assumiu valores semelhantes aos apresentados na literatura: 62.56 mg/L para *Pseudomonas putita* (Mathur, 2010), 3.98 mg/L para *Pseudomonas putita* 54G (MIRPURI *et al.*, 1997), 15.07 mg/L para *Pseudomonas putita* OI (OH *et al.*, 1994) e 5.00 mg/L para *Pseudomonas putita* F1 (BORDEL *et al.*, 2007). Já o estudo realizado com *Rhodococcus erythropolis*, por Malhautier *et al.* (2014), o valor obtido da constante de saturação foi de 0.39 mg/L , indicando um menor efeito inibitório sobre esse microrganismo.

Observou-se também que a *Pseudomonas aeruginosa* apresentou uma boa taxa de mineralização, já que os valores de $Y_{x/s}$, ou seja a taxa de substrato que é transformada em biomassa, foram maiores do que os apresentados na literatura para *Pseudomonas putita* F1: 0.60 (ROBLEDO-ORTÍZ *et al.*, 2011), 0.58 (ABUHAMED *et al.*, 2004).

Para avaliar a capacidade do modelo de se ajustar aos dados experimentais, inicialmente foi feita a análise gráfica e a consistência física dos parâmetros obtidos. Como estes apresentaram bons resultados, foi realizado o método da Análise de Variância (ANOVA). Neste foi calculado a soma dos desvios das previsões feitas pelo

modelo, em relação à média global, e a soma das diferenças entre os valores observados e os valores previstos. Os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: ANOVA para os dados do tolueno.

Fonte de variação	Soma Quadrática	n° de G.L.	Média Quadrática	F
50 mg/L (R² = 0.896)				
Regressão	7896.84	2	3948.42	81.72 ^a
Resíduos	918.01	19	48.32	
Total	8814.85			
80 mg/L (R² = 0.971)				
Regressão	18714.37	2	9357.19	315.79 ^a
Resíduos	562.99	19	29.63	
Total	19277.36			
100 mg/L (R² = 0.980)				
Regressão	31636.17	2	15818.08	474.31 ^a
Resíduos	633.64	19	33.35	
Total	32269.81			
120 mg/L (R² = 0.976)				
Regressão	46201.46	2	23100.73	385.83 ^a
Resíduos	1137.57	19	59.87	
Total	47339.03			
170 mg/L (R² = 0.971)				
Regressão	97417.41	2	48708.71	323.49 ^a
Resíduos	2860.90	19	150.57	
Total	100278.31			

^aF_{2,19;0.05}=3,52

Para o modelo ser bem ajustado, a soma quadrática residual deve ser pequena, de modo que os valores observados e previstos sejam próximos. E, desta forma, a soma quadrática total deve ser aproximadamente igual à soma quadrática da regressão.

Outra forma de avaliar o modelo é pelo teste F. Baseado nele, o modelo encontrado é preditivo, uma vez que o valor de F, calculado pela razão entre a média

quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos, foi maior do que o valor de F crítico e o menor coeficiente de regressão encontrado (0,896) foi próximo da unidade.

No que se refere à proporção da produção do ramnolipídeo pelo crescimento celular ($Y_{P/X}$), observa-se que os mais altos valores, ou seja, quando apresenta uma maior produção de biossurfactante, são obtidos quando a concentração de tolueno é alta. Esses valores foram obtidos através da Equação 10.

$$Y_{P/X} = \frac{P_f}{(X_f - X_0)} \quad (10)$$

Os valores obtidos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8: Valores de $Y_{P/X}$ para o tolueno.

Concentração (mg/L)	$Y_{P/X}$ (mg/mg)
50	0.09
80	0,11
100	0.11
120	0.14
170	0.18

O mesmo desempenho foi observado nos trabalhos de Santos *et al.* (2002), que obtiveram como melhor valor 0,487 g/g, e de Sousa *et al.* (2011), que obtiveram como melhor resultado 3,125 g/g, porém ambos trabalharam com glicerina como substrato.

Também foi possível calcular a conversão de substrato consumido em biossurfactante, sendo expresso pela Equação 11.

$$Y_{P/S} = \frac{P_f}{(S_0 - S_f)} \quad (11)$$

Os valores obtidos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Valores de $Y_{P/S}$ para o tolueno.

Concentração (mg/L)	$Y_{P/X}$ (mg/mg)
50	0.09
80	0,10
100	0.10
120	0.13
170	0.17

Embora esses valores dependam da espécie do microrganismo, com relação a um determinado substrato, não dependem somente da natureza deste; os demais componentes do meio também exercem influência sobre tais conversões, bem como o tempo de mistura e a transferência de oxigênio do sistema de agitação.

4.2.2 Etilbenzeno

Os resultados dos experimentos obtidos nos testes de biorremediação para o etilbenzeno podem ser observados nas figuras 24 e 25, abaixo, onde estão representados tanto os valores experimentais do consumo do substrato (S) quanto de crescimento da biomassa (X) ao longo do tempo (h), respectivamente.

Figura 24: Consumo de substrato em relação ao tempo.

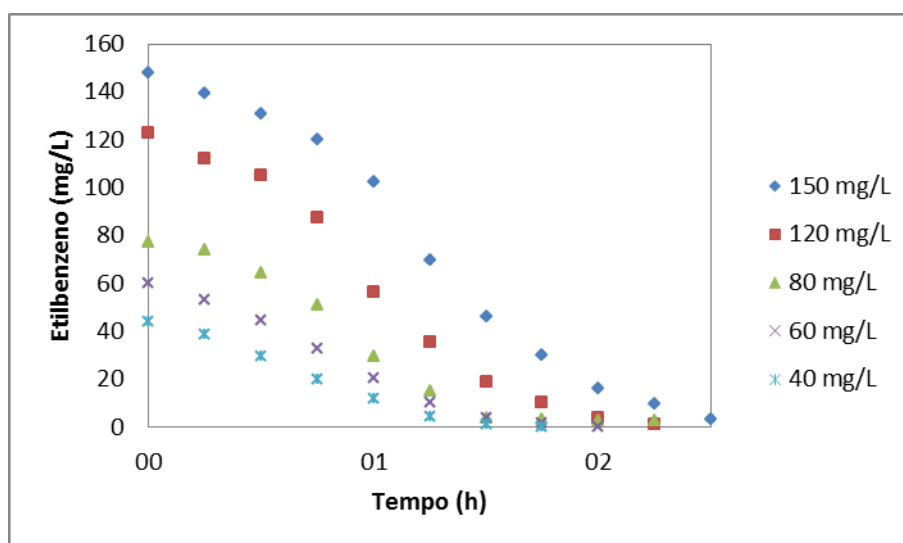
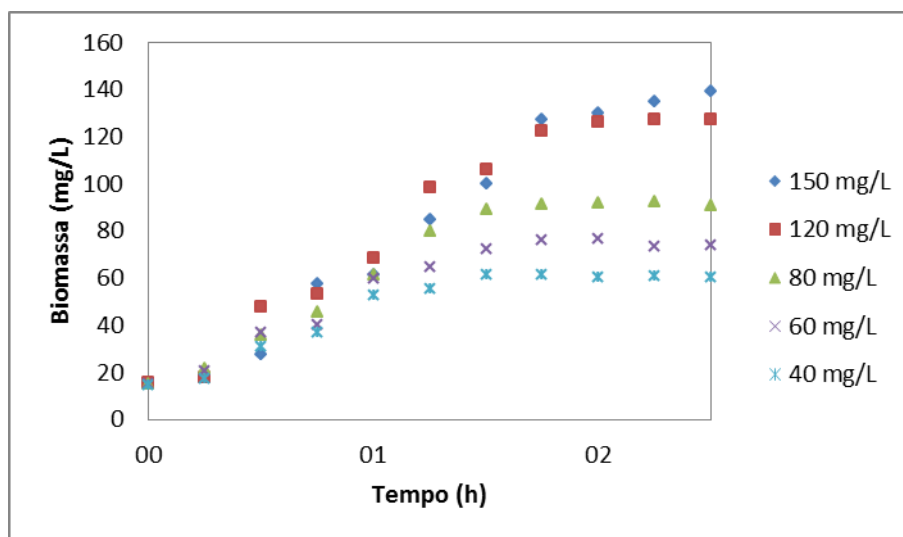


Figura 25: Crescimento da biomassa em relação ao tempo.



Pode-se verificar que, assim como o que foi observado para o tolueno, as curvas de consumo de substrato apresentam conformação semelhante e após 2 horas quase todas apresentaram um valor próximo à zero. Sendo que para maior concentração, de 150 mg/L, o consumo de mais de 80% do substrato só foi atingido após 1,75 hora. García-Pena et. al, 2008, conseguiram uma remoção próxima de 90% de etilbenzeno, para uma concentração inicial de 40 mg/L, em apenas 10 dias através do fungo *Paecilomyces variotii*. Parameswarappa et al (2008) atingiram uma remoção de quase 100% de etilbenzeno em 120 horas através das *Pseudomonas fluorescens-CS2*. EL-Naas et al. (2014), em seu artigo sobre biodegradação dos BTEX, fizeram uma compilação de resultados de remoção de etilbenzeno em diferentes meios de cultivo e para diferentes microrganismos. Ele apresentou remoções acima de 100% mas sempre para tempo de reação a partir de 48 horas.

Nas curvas de crescimento de biomassa, foi possível verificar que, como as obtidas utilizando o tolueno, nenhuma apresentou uma fase *lag* de crescimento, o que evidencia que não foi necessário um período de adaptação ao substrato e uma boa realização do pré-inóculo. Isso pode ser comprovado ao plotar a curva de $\ln X$ versus o tempo, o que indicou o início da fase exponencial de crescimento nos instantes iniciais de cultivo. Também foi possível observar que, com a redução da disponibilidade de carbono, ocorreu uma redução na taxa de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa*, esse fato também pode ser observado no estudo realizado por Drakou et. al, 2015, e Malhoutier et. al, 2014.

As tabelas contendo os dados experimentais e o valor do desvio padrão em cada medida pode ser observado no Anexo I. O baixo valor do desvio padrão mostra que o processo de mensuração utilizado obteve uma boa precisão.

Com base nesses resultados foram obtidos os parâmetros cinéticos do modelo de Monod, obtidos com a modelagem pelo método de Runge-Kutta quarta ordem, que encontram-se expressos na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos para o modelo de Monod.

Parâmetros	40-150 mg/L
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	1,48
$K_s (\text{mg/L})$	7,53
$Y_{x/s} (\text{mg/mg})$	0,85

Os gráficos que representam em conjunto os dados experimentais e os dados calculados podem ser observados abaixo. O Baixo valor das funções objetivo mostra uma boa acurácia dos valores calculados.

Figura 26: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o consumo do etilbenzeno.

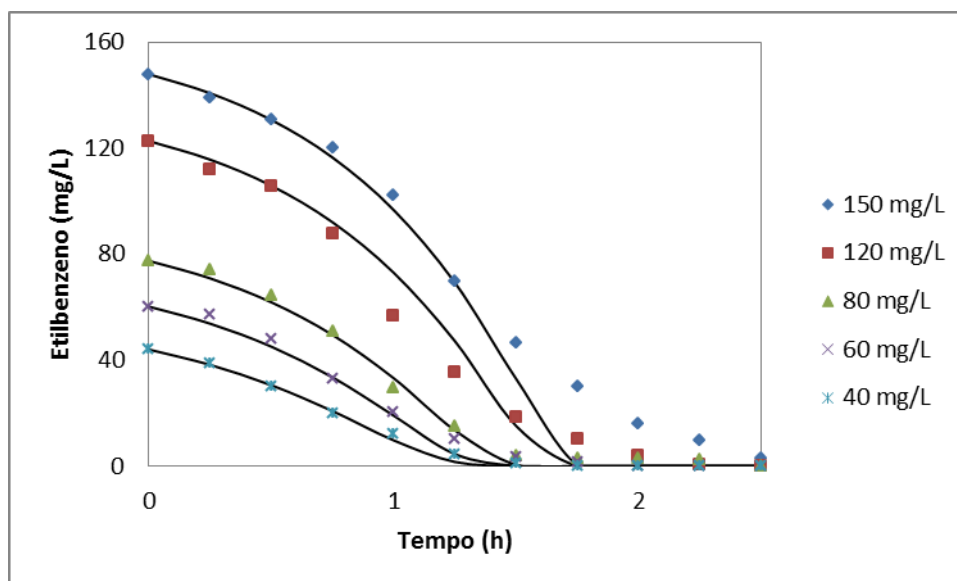
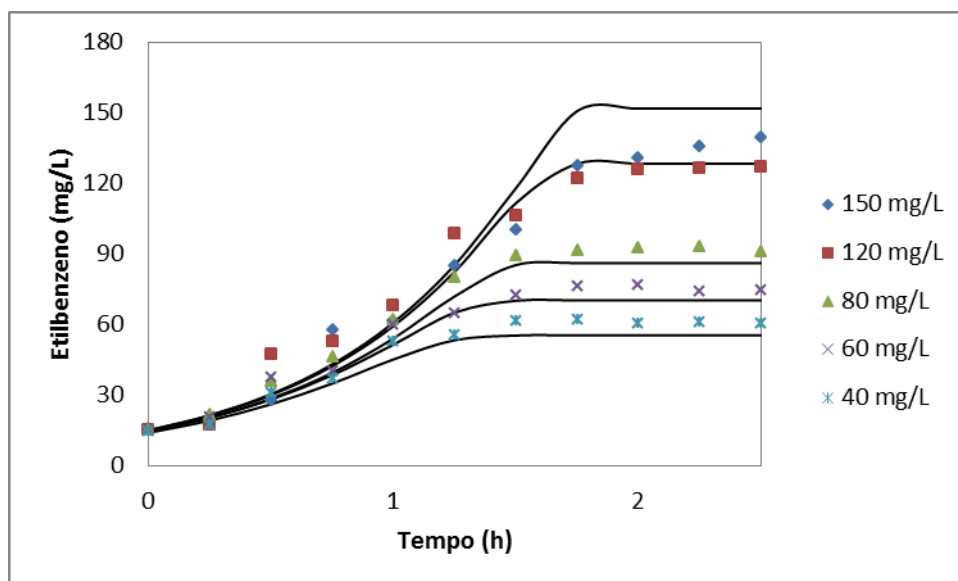


Figura 27: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o crescimento da biomassa.



O valor de $\mu_{\text{máx}}$ mostrou-se condizente com outros estudos realizados para biodegradação do etilbenzeno. Apesar de não serem encontrados na literatura valores que expressem os parâmetros para o modelo de Monod, no estudo realizado com o microrganismo *Rhodococcus rhodococcus* (Trigueros, 2010) foi obtido um valor semelhante.

A constante de saturação (K_s) apresentou uma ordem de grandeza maior do que o valor observado em outro estudo: 1,75 mg/L para *Rhodococcus rhodococcus* (Trigueros, 2010), o que indica um menor efeito inibitório sobre esse microrganismo.

Observou-se também que a *Pseudomonas aeruginosa* apresentou uma boa taxa de mineralização, já que os valores de $Y_{x/s}$, ou seja a taxa de substrato que é transformada em biomassa, apresentando valores semelhantes ao do tolueno.

Para avaliar a capacidade do modelo de se ajustar aos dados experimentais, inicialmente foi feita a análise gráfica e a consistência física dos parâmetros obtidos. Como estes apresentaram bons resultados, foi realizado o método da Análise de Variância (ANOVA). Neste foi calculado a soma dos desvios das previsões feitas pelo modelo, em relação à média global, e a soma das diferenças entre os valores observados e os valores previstos. Os resultados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11: ANOVA para os dados do etilbenzeno.

Fonte de variação	Soma Quadrática	n° de G.L.	Média Quadrática	F
40 mg/L (R² = 0.962)				
Regressão	5713.55	2	2856.78	240.13 ^a
Resíduos	226.04	19	11.90	
Total	5939.59			
60 mg/L (R² = 0.973)				
Regressão	10921.03	2	5460.52	342.03 ^a
Resíduos	303.33	19	15.96	
Total	11224.36			
80 mg/L (R² = 0.980)				
Regressão	18861.39	2	9430.70	464.16 ^a
Resíduos	386.04	19	20.32	
Total	19247.43			
120 mg/L (R² = 0.972)				
Regressão	48618.47	2	24309.23	327.35 ^a
Resíduos	1410.96	19	74.26	
Total	50029.43			
150 mg/L (R² = 0.954)				
Regressão	72423.38	2	36211.69	195.28 ^a
Resíduos	3523.33	19	185.44	
Total	75946.71			

^aF_{2;19;0.05}=3,52

Para o modelo ser bem ajustado, a soma quadrática residual deve ser pequena, de modo que os valores observados e previstos sejam próximos. E, desta forma, a soma quadrática total deve ser aproximadamente igual à soma quadrática da regressão.

Outra forma de avaliar o modelo é pelo teste F. Baseado nele, o modelo encontrado é preditivo, uma vez que o valor de F, calculado pela razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos, foi maior do que o valor de F crítico e o menor coeficiente de regressão encontrado (0,954) foi próximo da unidade.

No que se refere à proporção da produção do ramnolípídeo pelo crescimento celular ($Y_{P/X}$), observa-se que os mais altos valores, ou seja, quando apresenta uma

maior produção de biossurfactante, são obtidos quando a concentração de tolueno é alta. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de $Y_{P/X}$ para o etilbenzeno.

Concentração (mg/L)	$Y_{P/X}$ (mg/mg)
40	0.08
60	0,10
80	0.10
120	0.12
150	0.14

O mesmo desempenho foi observado nos trabalhos de Santos *et al.* (2002), que obtiveram como melhor valor 0,487 g/g, e de Sousa *et al.* (2011), que obtiveram como melhor resultado 3,125 g/g, porém ambos trabalharam com glicerina como substrato.

Também foi possível calcular a conversão de substrato consumido em biossurfactante. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13: Valores de $Y_{P/S}$ para o etilbenzeno.

Concentração (mg/L)	$Y_{P/X}$ (mg/mg)
40	0.08
60	0,10
80	0.10
120	0.11
150	0.12

4.2.3 Benzeno

Os resultados dos experimentos obtidos nos testes de biorremediação para o benzeno podem ser observados nas Figuras 28 e 29, abaixo, onde estão representados tanto os valores experimentais do consumo do substrato (S) quanto de crescimento da biomassa (X) ao longo do tempo (h), respectivamente.

Figura 28: Consumo de substrato em relação ao tempo.

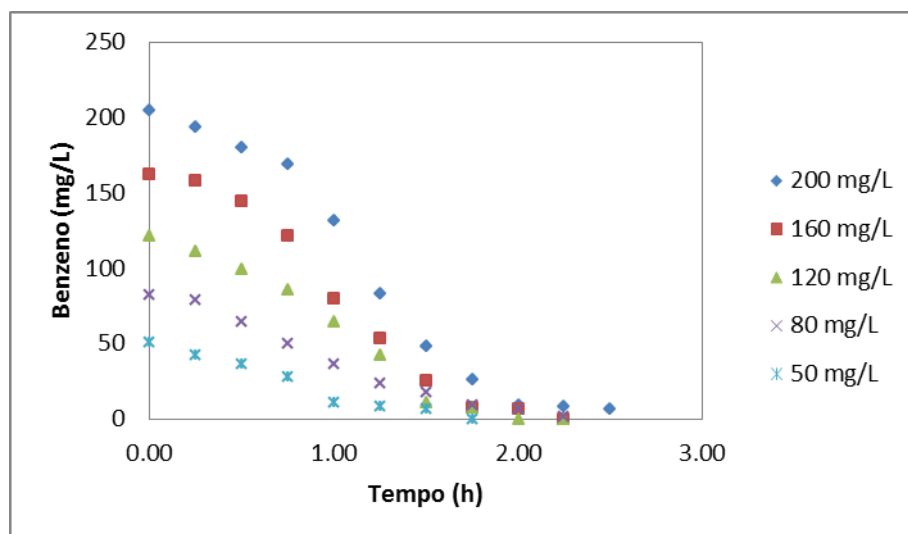
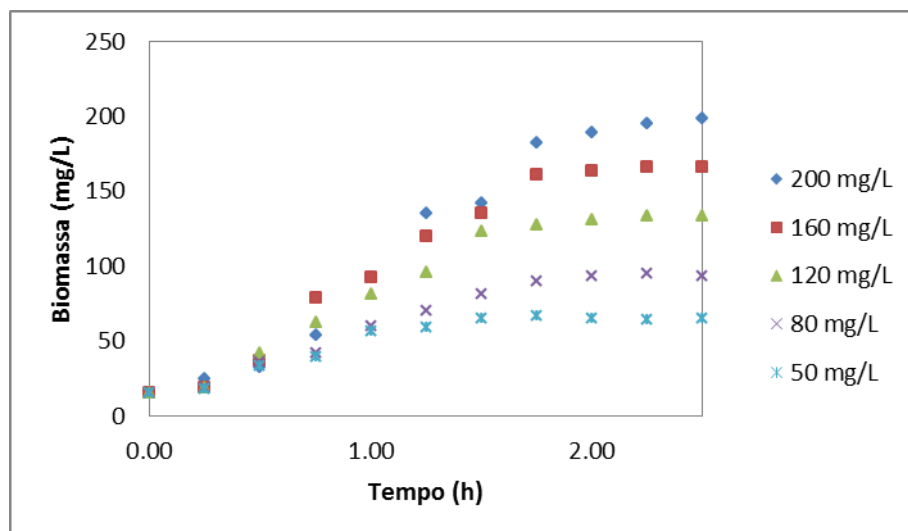


Figura 29: Crescimento da biomassa em relação ao tempo.



É possível verificar que as curvas de consumo de substrato apresentam conformação semelhante e após 2 horas todas apresentaram um valor próximo à zero. Para a maior concentração, de 200 mg/L, no tempo de 1,75 horas, o consumo de substrato já era superior a 80 %. Singh *et al* (2010) conseguiram uma remoção de 100% de benzeno apenas em 48 h e para uma condição inicial de 10% v/v. EL-Naas *et al.* (2014), em seu artigo sobre biodegradação dos BTEX, fizeram uma compilação de resultados de remoção de benzeno em diferentes meios de cultivo e para diferentes microrganismos. Eles apresentaram remoções acima de 80 %, porém o menor tempo apresentado para uma remoção completa foi de 6h de cultivo.

Nas curvas de crescimento de biomassa, foi possível verificar que nenhuma apresentou uma fase *lag* de crescimento, o que evidencia que não foi necessário um período de adaptação ao substrato e uma boa realização do pré-inóculo. Isso pode ser comprovado ao plotar a curva de $\ln X$ versus o tempo, o que indicou o início da fase exponencial de crescimento nos instantes iniciais de cultivo. Também foi possível observar que, com a redução da disponibilidade de carbono, ocorreu uma redução na taxa de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa*, esse fato também pode ser observado nos substratos anteriormente estudados.

As tabelas contendo os dados experimentais e o valor do desvio padrão em cada medida pode ser observado no Anexo I. O baixo valor do desvio padrão mostra que o processo de mensuração utilizado obteve uma boa precisão.

Com base nesses resultados foram obtidos os parâmetros cinéticos do modelo de Monod, obtidos com a modelagem pelo método de Runge-Kutta quarta ordem, que encontram-se expressos na Tabela 14.

Tabela 14: Parâmetros cinéticos para o modelo de Monod.

Parâmetros	50-200 mg/L
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	1,72
$K_s (\text{mg/L})$	16,53
$Y_{x/s} (\text{mg/mg})$	0,84

Os gráficos que representam em conjunto os dados experimentais e os dados calculados podem ser observados abaixo. O baixo valor das funções objetivo mostra uma boa acurácia dos valores calculados.

Figura 30: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o consumo do benzeno.

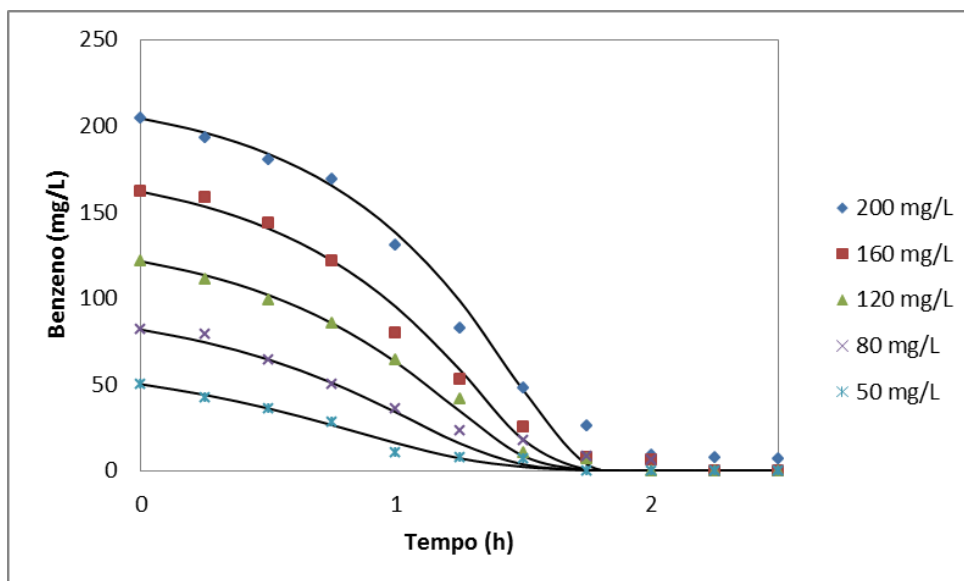
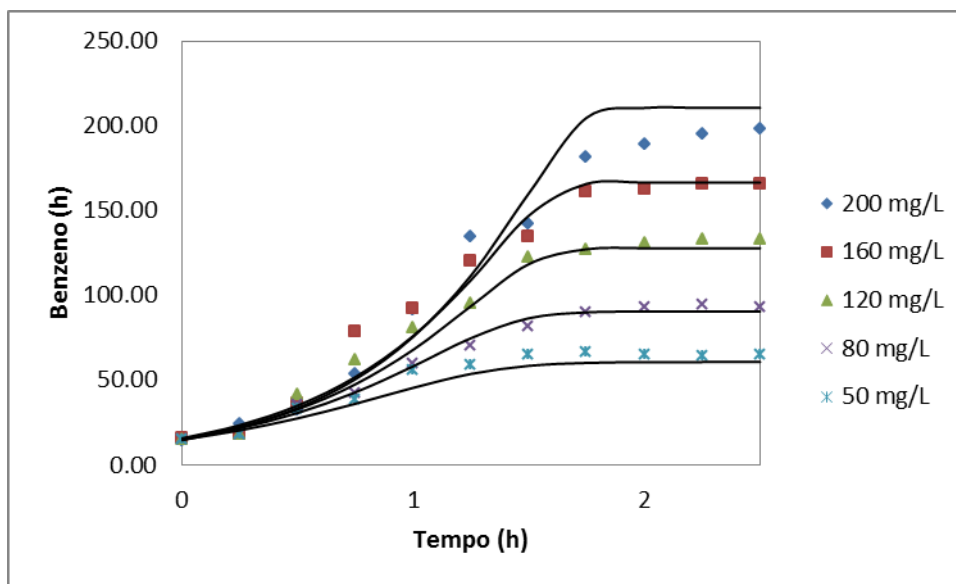


Figura 31: Simulação do modelo de Monod e dos dados experimentais para o crescimento da biomassa.



O valor de $\mu_{\text{máx}}$ mostrou-se condizente com outros estudos realizados para diferentes tipos de *Pseudomonas*: 0.1613 h^{-1} para *Pseudomonas putita* (MATHUR, 2010), 0.5 h^{-1} para *Pseudomonas putita F1* (ROBLEDO-ORTLZ, 2011) e 0.75 h^{-1} para *Pseudomonas putita F1* (ABUHAMED et al., 2004).

A constante de saturação (K_s) também assumiu valores semelhantes aos apresentados na literatura: 71.18 mg/L para *Pseudomonas putita* (MATHUR, 2010), 10.11 mg/L para *Pseudomonas putita F1* (ROBLEDO-ORTLZ, 2011) 1.65 mg/L para *Pseudomonas putita F1* (ABUHAMED et al., 2004) e 1.11 mg/L para *Rhodococcus rhodococcus* (TRIGUEROS et al, 2010), indicando um menor efeito inibitório sobre esse microrganismo.

Observou-se também que a *Pseudomonas aeruginosa* apresentou uma boa taxa de mineralização, já que os valores de $Y_{x/s}$, ou seja a taxa de substrato que é transformada em biomassa, foram maiores do que os apresentados na literatura para *Pseudomonas putita F1*: 0.60 (ROBLEDO-ORTÍZ et al., 2011), 0.75 (ABUHAMED et al., 2004).

Para avaliar a capacidade do modelo de se ajustar aos dados experimentais, inicialmente foi feita a análise gráfica e a consistência física dos parâmetros obtidos. Como estes apresentaram bons resultados, foi realizado o método da Análise de Variância (ANOVA). Neste foi calculado a soma dos desvios das previsões feitas pelo

modelo, em relação à média global, e a soma das diferenças entre os valores observados e os valores previstos. Os resultados encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15: ANOVA para os dados do benzeno.

Fonte de variação	Soma Quadrática	n° de G.L.	Média Quadrática	F
50 mg/L (R² = 0.949)				
Regressão	7063.41	2	3531.71	178.32 ^a
Resíduos	376.30	19	19.81	
Total	7439.71			
80 mg/L (R² = 0.977)				
Regressão	20101.67	2	10050.83	400.63 ^a
Resíduos	476.67	19	25.09	
Total	20578.34			
120 mg/L (R² = 0.986)				
Regressão	46999.60	2	23499.80	663.11 ^a
Resíduos	673.34	19	35.44	
Total	47672.94			
160 mg/L (R² = 0.980)				
Regressão	85946.55	2	42973.28	467.41 ^a
Resíduos	1746.83	19	91.94	
Total	87693.38			
200 mg/L (R² = 0.976)				
Regressão	143168.93	2	71584.48	381.14 ^a
Resíduos	3568.51	19	187.82	
Total	146737.44			

^aF_{2;19;0.05}=3,52

Para o modelo ser bem ajustado, a soma quadrática residual deve ser pequena, de modo que os valores observados e previstos sejam próximos. E, desta forma, a soma quadrática total deve ser aproximadamente igual à soma quadrática da regressão.

Outra forma de avaliar o modelo é pelo teste F. Baseado nele, o modelo encontrado é preditivo, uma vez que o valor de F, calculado pela razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos, foi maior do que o valor de F crítico e o menor coeficiente de regressão encontrado (0,949) foi próximo da unidade.

No que se refere à proporção da produção do ramnolipídeo pelo crescimento celular ($Y_{P/X}$), observa-se que os mais altos valores, ou seja, quando apresenta uma maior produção de biossurfactante, são obtidos quando a concentração de tolueno é alta. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16: Valores de $Y_{P/X}$ para o benzeno.

Concentração (mg/L)	$Y_{P/X}$ (mg/mg)
50	0.12
80	0,14
100	0.16
120	0.18
170	0.18

O mesmo desempenho foi observado nos trabalhos de Santos *et al.* (2002), que obtiveram como melhor valor 0,487 g/g, e de Sousa *et al.* (2011), que obtiveram como melhor resultado 3,125 g/g, porém ambos trabalharam com glicerina como substrato.

Também foi possível calcular a conversão de substrato consumido em biossurfactante. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17: Valores de $Y_{P/S}$ para o benzeno.

Concentração (mg/L)	$Y_{P/X}$ (mg/mg)
50	0.12
80	0,14
120	0.15
160	0.16
200	0.17

4.3 Avaliação da cinética para os compostos monoaromáticos

Com o propósito de avaliar qual composto apresentou uma melhor afinidade com a *Pseudomonas aeruginosa*, foi realizado um estudo comparativo para uma mesma concentração das três substâncias, 80 mg/L. Abaixo, nas Figuras 32 e 33, é possível

observar os gráficos contendo os dados experimentais de consumo de substrato e de crescimento de biomassa para cada substância.

Figura 32: Dados experimentais do consumo de substrato para 80 mg/L.

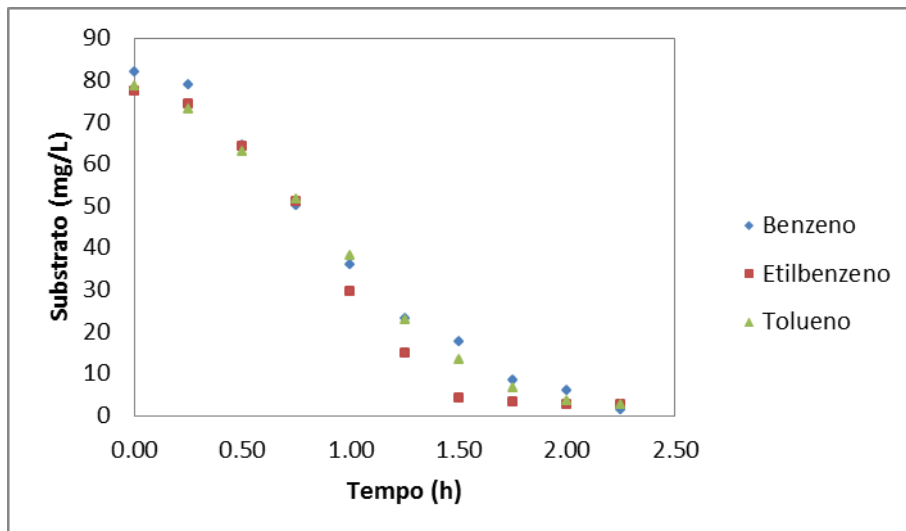
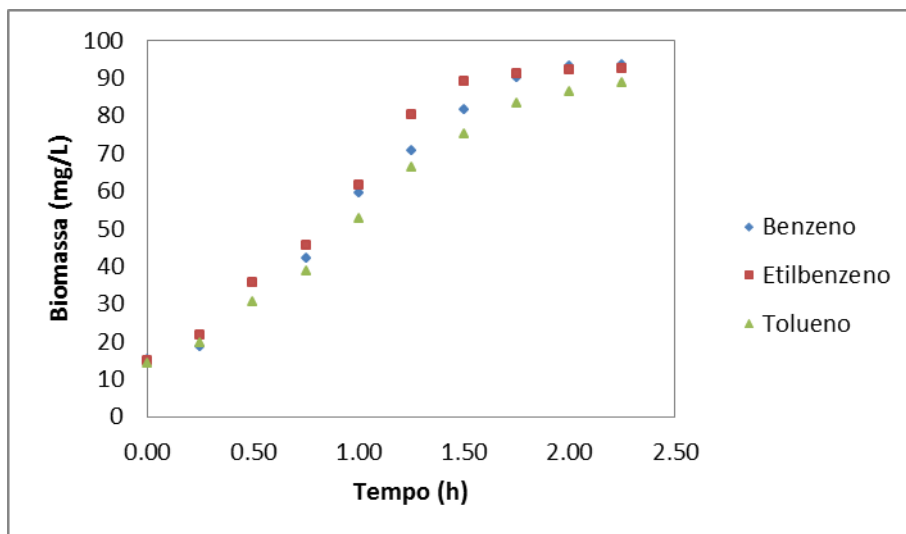


Figura 33: Dados experimentais do crescimento da biomassa para 80 mg/L.



Como o formato da cinética seguiu o mesmo modelo para os três substratos, uma melhor avaliação será feita através dos parâmetros cinéticos de Monod e Andrews, observados na Tabela 18.

Tabela 18: Parâmetros cinéticos.

Parâmetro	Composto		
	Benzeno	Etilbenzeno	Tolueno
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	1,86	1,48	1,72
Ks (mg/L)	22,67	7,53	16,53
Yx/s (mg/mg)	0,848	0,851	0,849
Yp/x (mg/mg)	0,140	0,100	0,110

Para o modelo de Monod, a taxa de crescimento específico se mostra semelhante para os três compostos, porém é observada que esta velocidade aumenta para uma menor quantidade de carbono na formula estrutural. Mathur (2010), em seu estudo com *Pseudomonas putida*, também observou um consumo mais rápido do benzeno em relação ao tolueno, porém seu trabalho não contemplou o etilbenzeno.

O menor valor de Ks foi obtido para o etilbenzeno, isso indica que o microrganismo apresentou uma maior afinidade com esse composto, e desta forma resultou em um maior valor para o coeficiente de rendimento $Y_{X/S}$. Isso pode ser explicado pelo fato de grupos no anel aromático afetarem sua reatividade. A presença de grupos alquil ativa o anel, tornando-o mais reativo. Quanto maior a cadeia do grupo alquil, maior a densidade elétrica doada, o que explica a maior afinidade do etilbenzeno em relação aos demais compostos estudados. Littlejohns (2008) também notou um menor valor da constante de saturação para o etilbenzeno, porém seu estudo foi realizado com um consorcio bacteriano. Trigueiros *et al.* (2008) também observou um maior valor do Ks para o benzeno utilizando uma cultura de bactérias.

Algumas investigações têm considerado o benzeno um composto recalcitrante em condições anaeróbicas. Este comportamento geralmente é explicado devido à estabilização das ligações carbono-carbono e a estrutura simétrica do anel que tornam o benzeno altamente resistente à quebra, além de outros fatores (TRIGUEROS, 2008).

Já no que se refere à produção de biossurfactante, o benzeno apresentou uma maior taxa de geração, representado pelo maior valor do parâmetro $Y_{P/X}$.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Este trabalho pode contribuir para uma melhor aproximação da modelagem matemática de processos de biorremediação individual de compostos monoaromáticos. Isto permite um avanço no estudo da biodegradação de compostos tóxicos, visto que estes causam grandes prejuízos tanto para o meio ambiente como para a saúde humana.

Verificou-se que para todos os substratos as curvas de crescimento de biomassa apresentaram um perfil semelhante e que nenhuma apresentou uma fase *lag* de crescimento. Isto evidencia que não foi necessário um período de adaptação ao substrato e uma boa realização do pré-inóculo. Também foi possível observar que, com a redução da disponibilidade de carbono, ocorreu uma redução na taxa de crescimento da *Pseudomonas aeruginosa*.

No que se refere às curvas de consumo de substrato, estas também apresentaram conformação semelhante e para nenhum substrato foi necessário um tempo maior do que 2,5 horas para degradar o anel aromático.

A partir da avaliação do desempenho de dois modelos cinéticos de crescimento microbiano, Monod e Andrews, foi observado que apenas o modelo de Monod prediz satisfatoriamente os dados experimentais. Isso se deve ao fato de Monod se aplicar para casos em que não há presença de inibidores de crescimento no meio de cultura e conseguir representar bem a cinética de crescimento celular quando não existe fase *lag* no início do processo.

Além disso, foi observado que, para qualquer dos compostos estudados, o coeficiente de rendimento no consumo do substrato ($Y_{X/S}$) apresentou valores elevados, demonstrando uma alta taxa de mineralização dos compostos tóxicos. Enquanto isso, o incremento da concentração inicial de substrato provocou um aumento no valor do coeficiente de rendimento para a geração de produto ($Y_{P/X}$), o que indica uma maior produção do biossurfactante. Apesar disso, um estudo mais aprofundado sobre a geração do ramnolipídeo deve ser realizado.

Ao comparar o desempenho da *Pseudomonas aeruginosa* com os substratos estudados, observa-se que o microrganismo apresentou uma taxa de crescimento semelhante para os três compostos. No entanto, foi exibida uma maior afinidade pelo etilbenzeno, o que proporcionou uma maior taxa de mineralização.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - ANP. Glossário do Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo e do Gás Natural – 2004. Disponível em: www.anp.gov.br/doc/anuario2004/Glossario_do_Anuario_2004.pdf. Acesso em: 24 de março de 2014.

ABUHAMED, T., BAYRAKTAR, E., MEHMETOGLU, T., MEHMETOGLU, U. Kinetics model for growth of pseudomonas putida F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. **Process Biochemistry**, v.39, p. 983-988, 2004.

AHMADUM, F. R.; PENDASHTEH, A.; ABDULLAH, L. C.; BIAK, D. R. A.; MADAENI, S. S.; ABIDIN, Z. Z. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v.170, p. 530-551, 2009.

AIVALIOTI, M. *et al.* Removal of BTEX, MTBE and TAME from aqueous solutions by adsorption onto raw and thermally treated lignite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 207, p. 136-146, 2011.

ALAJABEG, I. *et al.* Comparison of the composition of some petroleum samples which be applied for the skin and mucous membrane treatment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, p. 75-84, 2000.

ALISI, C.; MUSELLA, R.; TASSO, F.; UBALDI, C.; MANZO, S.; CREMISINI, C.; SPROCATI, A. R. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. **Science of the Total Environment**, n.407, p.3024–3032, 2009.

ALLSOP, P. J.; CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M.; SULLIVAN, G. R. Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*. **Biotechnol Bioeng**, v.41, p.572-580, 1993.

ALVA-ARGÁEZ, A.; KOKOSSIS, A.C.; SMITH, R. The design of water-using systems in petroleum refining using a water-pinch decomposition. **Chemical Engineering Journal**, v. 128, n. 1, p. 33-46, 2007.

AMINI, S.; MOWLA, D.; GOLKAR, M.; ESMAEILZADEH, F. Mathematical modelling of a hydrocyclone for the down-hole oil-water separation (DOWS). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, p. 2186-2195, 2012.

ANDRADE, V. T.; ANDRADE, B. G.; COSTA, B. R.; DEZOTTI, M. C., JÚNIOR, O. A., 2009, Toxicity Assessment of Oil Field Produced Water Treated by Evaporative Processes to Produce Water to Irrigation. In: *7th IWA World Congress on Water Reclamation and Reuse*, IWA-1658R1, Brisbane, Australia, 20-24 september.

ATLAS, Ronald. Fate of Petroleum Pollutants in Arctic Ecosystems. **Water Science Technology**, v. 18, n. 2, p. 59-67, 1986.

AVCI, A.; KAÇMAZ, M.; DURAK, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industrial. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 1-5, 2003.

AYOTAMUNO, M.J. *et al.* Petroleum contaminated ground-water: remediation using activated carbon. **Applied energy**, v. 83, n. 11, p. 1258–1264, 2006.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1986.

BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, p. 155-164, 1998.

BAPTISTA, P. M., RIZZO, A. C. de. L. Acompanhamento do processo de Atenuação Natural de solo contaminado por petróleo. **XII Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT**, 2004.

BARRON, M. G. *et al.* Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? **Aquatic Toxicology**, v. 46, p. 253-268, 1999.

BERTIN, L. *et al.* Biodegradation of polyethoxylated nonylphenols in packed-bed biofilm reactors. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 6681–6687, 2007.

BIELEFELDT, A. R.; STENSEL, H. D. Modeling competitive inhibition effects during biodegradation of BTEX mixtures. **Water Research**, v.33, n.3, p.707-714, 1999.

BITTKAU, A. *et al.* Enhancement of the biodegradability of aromatic groundwater contaminants. **Toxicology**, v. 205, n. 3, p. 201–210, 2004.

BORDEL, S.; MUNOZ, R.; DÍAZ, L. F.; VILLAVERDE, S. New insights on toluene biodegradation by *Pseudomonas putida* F1: influence of pollutant concentration and excreted metabolites. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 74, p. 857-866, 2007.

BORDEN, R. C.; GOMEZ, C. A.; BECKER, M. T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. **Ground Water**, v. 33(2), p. 180-189, 1995.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução nº.430/2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasília, 2011.

BRITO, G.C.B.; SOUZA, D.B.S.; VASCONCELOS, F.C.W.; BRAGA, L.C. The importance of microorganism bioprospection in areas contaminated by products derived from oil. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente** n.3, p. 291-310, 2010.

CALLADO, N. R.; SILVA, J. B.; LOPES, J. Levantamento das fontes geradoras de resíduos de petróleo no estado de Alagoas. In: GESTÃO E TRATAMENTO DE RESÍDUOS LÍQUIDOS GERADOS NA CADEIA PRODUTIVA DO PETRÓLEO: 1ª

coletânea de trabalhos técnicos. Anais. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2006. p. 15-30.

CAMEOTRA, S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 16, 2009.

CARNEIRO, Patrícia Marques. **Remoção de BTEX em biorreatores anaeróbios sob condições metanogênicas, desnitrificantes e sulfetogênicas**. 2012. 130f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil- Saneamento Ambiental) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

CATTONY, E. B. *et al.* Ethanol and toluene removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulphate. **Biotechnology Bioengineering**, v. 91 n. 2, p. 244-253, 2005.

CHANDRASEKARAN, E.V.; BEMILLER, J.N. Constituint analysis of glycoaminoglycans. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v.III, **Academic Press**, New York, p. 89-96, 1980.

CETESB. Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. **O Gerenciamento de áreas contaminadas no Estado de São Paulo**, 2008. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_08.pdf
Acesso em: dez. 2014.

COATES, J. D.; ANDERSON, R. T. Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments. **Trends Biotechnology**, v. 18, n.10, p. 408-12, 2000.

CORSEUIL H. X.; MARINS, M. D. Efeitos causados pela mistura de gasolina e álcool em contaminações de águas subterrâneas. **Boletim Técnico Petrobrás**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 3/4, p. 133-138, 1998.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Water Science Technology**, v. 34, n. 7/8, p. 311-318, 1996.

CUNNINGHAM, C.J., PHILP, J.C. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex-situ treatment of diesel contaminated soil. **Land Contamination and Reclamation**. v. 8, p. 261–269, 2000.

DE NARDI, I. R. *et al.* Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. **Process Biochemical**, v. 40, n. 2, p. 587-592, 2005.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 61, n.1, p.47-64, 1997.

DESAI, J.D.; DESAI, A.J. **Production of Biosurfactants**. In: Kosaric, N. Biosurfactants: production, properties, applications. New York: Ed. Marcel Dekker, p. 65-97, 1993.

DONAIRE, P. P. R. **Tratamento de água subterrânea contaminada com BTEX utilizando fotocatalise heterogênea**. 2007. 93f. Tese de doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

DOS SANTOS, Deodato Peixoto. **Determinação eletroquímica de fenóis após processo de degradação de benzeno usando sensor à base de nanotubos de carbono-ftalocianina de cobalto**. 2012. 102f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo. 2012.

DOTT, W. *et al.* Comparison of ex situ and in situ techniques for bioremediation of hydrocarbon-polluted soils. **International biodeterioration and biodegradation**, v. 35, p. 301-316, 1995.

DOU, J. *et al.* Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 720–729, 2008.

DRAKOU, E.; KOUTINAS, M.; PANTELIDES, I.; TSOLAKIDOU, M.; VYRIDES, I. Insights into the metabolic basic of the halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain LVD-10 during toluene biodegradation. **Internacional Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 85-94, 2015.

EL-NAAS, M. H.; ACIO, J. A.; EL TELIB, A. E. Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.2, p. 1104-1122, 2014.

EPA (United States Environmental Protection Agency). **A Citizen's Guide to Air Stripping**. Office of Solid Waste and Emergency Response, 2001.

EVANS, GARETH; FURLONG, JUDITH C. Environmental biotechnology: theory and application. **New York: John Wiley & Sons**, 2003.

FAKHRU'L-RAZIA, A.; PENDASHTEH, A.; ABDULLAH, L.C.; BIAK, D.R.A.; MADAENI, S.S.; ABIDIN, Z.Z. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v.170, n. 1-2, p. 530-551, 2009.

FALCÓ, I. P., MOYA, M. N. Analysis of volatile organic compounds in water. **L.M.L. Nollet (Ed.), Handbook of water analysis**, CRC Press, New York, p. 599–666, 2007.

FANG, C. S.; LIN, J. H. Air stripping for treatment of produced water, **J. Petr. Tech.**, v. 40, n. 5, p. 619-624, 1988.

FARHADIAN, M. *et al.* Accurate quantitative determination of monoaromatic compounds for the monitoring of bioremediation processes. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 173-178, 2009.

FARHADIAN, B.M.; DUCHEZA, D.; VACHELARDA, C.C.; LARROCHEA, C. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors – a review. **Water Research**, v. 42, p. 1325-1341, 2008.

FENOTTI, A. R. *et al.* Evaluation of the ethanol influence over the volatilization grade of BTEX in soil impacted by gasoline/ethanol spills. **Eng Sanit Ambient**. v.14, p. 443-448, 2009.

FERNANDES, M. **Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com gasolina**. 1997. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1997.

FERNANDES JUNIOR, W. E. **Projeto e Operação em Escala Semi-Industrial de um Equipamento de Águas Produzidas na Indústria do Petróleo Utilizando Nova Tecnologia: Misturador-decantador à Inversão de Fases (MDIF)**. 2006. 197 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2006.

FERNANDES, F. M.; ALCÂNTARA, G. Z. **Bioremediação de solos: estado da arte**. Disponível em: <<http://www.Daqbi.cefet.br/professores/mauricio/pedologia/Bioremediacao%e7%e3odesolo.pdf>>. Acesso em: jan. 2015.

FERREIRA, Sayonara. **Estudos laboratoriais para avaliação do potencial de contaminação de água e de solo por gasolina oxigenada**. 2000. 257 f. Doutorado (Programa de Pós Graduação em Geotécnica – Mestrado e Doutorado) - Universidade de São Carlos, São Carlos, 2000.

FOGAÇA, Jennifer Rocha Vargas. **Ligações de Hidrogênio**; Brasil Escola. Disponível em <<http://www.brasilecola.com/quimica/ligacoes-hidrogenio.htm>>. Acesso em 11 de outubro de 2015.

FONSECA, Martha. **Química**: química orgânica. Ed. São Paulo: FTD, 368 p., 1992.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Quimica Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

GARCÍA-PENA, I.; ORTIZ, I.; HERNÁNDEZ, S.; REVAH, S. Biofiltration of BTEX by the fungus *Paecilomyces variotii*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p.442-447, 2008.

GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R.N.Z.A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n.54, p.61–67, 2004.

GIBOTTI, M. **Subsídios geológico-geotécnicos para a implantação de tanques de armazenagem subterrânea de combustíveis: estudo de caso em um solo da Formação Rio Claro**. 1999. 95f. Dissertação (Mestrado em Geociências e Meio Ambiente), Universidade Estadual Paulista, 1999.

GUIEYSSE, B. *et al.* Degradation of acenaphthene, phenanthrene and pyrene in a packed-bed biofilm reactor. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 6, p. 826–831, 2000.

GUSMÃO, V. R. *et al.* Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period. **Journal Hazardous Materials**, v. 139 n. 2, p. 301–309, 2007.

HERRMANN, J.M. Eliminación de contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea. Cap. 10, **Colección Documentos Ciemat**, 388 p., 2004.

HONG, A.; FANE, A.G.; BURFORD, R. The effects of intermitente permeate flow and crossflow on membrane coalescence of oil-in-water emulsions. **Desalination**, v. 44, n. 1-2, p. 185-191, 2002.

ITOH S., HONDA H., TOMITA F., SUZUKI T. Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. **Journal of Antibiotics**, v. 24, p. 855-859, 1971.

JACQUES, R.J.S. *et al.* Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.11, n.1, p.1-11, 2007.

JALILI, H.; RAZAVI, M. Effect of whey permeate and yeast extract on metabolic activity of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb 12 cultivated in skim milk based media. **Irian Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 38-45, 2010.

JO, M. S. *et al.* An analysis of synergistic and antagonistic behavior during BTEX removal in batch system using response surface methodology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 1276-1284, 2008.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v.39, n.4, p.295-304, 2001.

KRONEMBERGER, F.A.; SANTA ANNA, L.M.M.; MENEZES, R.R.; FERNANDES, A.C.L.B.; BORGES, C.P.; FREIRE, D.M.G. Controle da Oxigenação na Produção de Biossurfactantes em Biorreator, **SINAFERM**, Curitiba-PR, 2007.

KRYST, K.; KARAMANEV, D.G. Aerobic phenol biodegradation in an inverse fluidized-bed biofilm reactor. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 40, n.23, p. 5436–5439, 2001.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnolipids-biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 51, p. 22-32, 1999.

LAWRENCE, A. W.; MILLER, J. A.; MILLER, D. L.; HAYES, T.D. Regional Assessment of Produced Water Treatment and Disposal Practices and Research Needs. **Society of Petroleum Engineers (SPE) 029729**, p. 373- 392, 1995.

ŁEBKOWSKA, MARIA; ZBOROWSKA, E.; KARWOWSKA, E.; MIASKIEWICZPESKA, E.; MUSZYNSKI, A.; TABERNACKA, A.; NAUMCZYK, J.; JECZALIK, M. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. **Ecological Engineering**, n.37, p. 1895-1900, 2011.

LIN, C.W.; CHENG, Y.W.; TSAI, S.L. Multi-substrate biodegradation kinetics of MTBE and BTEX mixtures by *Pseudomonas aeruginosa*. **Process Biochemistry**, v. 42 p. 1211-1217, 2007.

LITTLEJOHNS, J.V.; DAUGULIS, A.J. Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium, **Process Biochemistry**, v.43 p.1068-1076, 2008.

MALHAUTIER, L.; QUIJANO, G.; AVEZAC, M.; ROCHER, J.; FANLO, J. L. Kinetic characterization of toluene biodegradation by *Rhodococcus erythropolis*: Towards a rationale for microflora enhancement in bioreactors devoted to air treatment. **Chemical Engineering Journal**. v. 247, p. 199-204, 2014.

MARIANO, Adriano. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminadas com óleo diesel**. 2006. 162 f. Doutorado (Programa de Pós Graduação em Geociências e Meio Ambiente – Mestrado e Doutorado) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARIANO, Jacqueline Barboza. **Impactos Ambientais do refino do petróleo**. 2001. 216f. Dissertação (Mestrado em ciências e planejamento energético) – Coordenação dos Programas de Pós-graduação em Engenharia – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

MARTÍNEZ, S.; CUERVO-LÓPEZ, F. M.; GOMEZ, J. Toluene mineralization by denitrification in an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1717–1723, 2007.

MASSALHA, N.; BASHERR, S.; SABBAH, I. Effect of adsorption and bead size of immobilized biomass on the rate of biodegradation of phenol at high concentration levels. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 6820–6824, 2007.

MATHUR, A.K. Kinetics modelling of the biodegradation of benzene, toluene and phenol as single substrate and mixed substrate by using *Pseudomonas putida*, **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v.24, p. 101-109, 2010.

MAZZEO, D E. C. et al. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4334–4340, 2010.

MENEGHETTI, Liliane. **Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. 2007. 112 f. Mestrado (Programa de Pós Graduação em Engenharia) – Faculdade de Engenharia e Arquitetura – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007.

MELLO, Josiane Maria Muneron. **Biodegradação dos BTEX em um reator com biofilme**. 2007. 151f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MELLO, J. M. M. et al. Simulação Numérica do Benzeno em um Reator de Leito Fluidizado. **Rio Oil & Gás** 2006. Anais em CD, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

MENDES, R. Exposição ocupacional ao benzeno e seus efeitos sobre a saúde dos trabalhadores. **Revista da Associação Médica do Brasil**, v. 39, p. 249-256, 1993.

MIGUEZ, M., BOTELHO, P. N., AZEREDO, N., COELHO, M.A.Z., AMARAL, P. F. F. Selection of yeasts for the production of L-phenyl acetyl carbinol. **Chemical Engineering Transactions**, v.27, p.163–168, 2012.

MILHOME, M. A. L. **Emprego de quitina e quitosana para adsorção de fenol de efluente de refinaria de petróleo**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil – Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2006.

MIRPURI, R.; JONES, W.; BRYERS, J. D. Toluene degradation kinetics for planktonic and biofilm-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. **Biotechnol. Bioeng.** v. 53, p. 535-546, 1997.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2002.

MROZIK, AGNIESZKA; PIOTROWSKA-SEGET, ZOFIA. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. **Microbiological Research.** v. 165, p. 363-375, 2010.

MULLIGAN, C.N. Environmental application for biosurfactants **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NETO, M. A. F. *et al.* Emprego de reatores biológicos com fungos para remoção de compostos nitrogenados presentes em efluentes de indústrias petroquímicas. In: Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos. **Anais**. Recife: Editora Universitária da UFPE. p. 167-182, 2006.

OGP (International Association of Oil and Gas Producers). Aromatics in produced Water: Occurrence, Fate and Effects and Treatment. **Report n.1.20/324**, p.1 – 17, 2002.

OH, Y. S.; SHAREEFDEEN, Z.; BALTZIS, B. C.; BARTHA, R. Interactions between benzene, toluene and p-xylene (BTX) during their biodegradation. **Biotechnol. Bioeng.** v.44, p.533-538, 1994.

OHLEN, K. *et al.* Enhanced degradation of chlorinated ethylenes in groundwater from a paint contaminated site by two-stage fluidizedbed reactor. **Chemosphere**, v. 58, n.3, p. 373–377, 2005.

OLIVEIRA, E. C. *et al.* Degradação de fenóis por leveduras presentes em águas residuárias de refinarias de petróleo. In: Gestão e tratamento de resíduos líquidos

gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos. **Anais**. Recife: Editora Universitária da UFPE. p. 133-148, 2006.

OLIVEIRA, F. J. S.; VASQUEZ, L.; FRANÇA, F. P. **Production of biosurfactants by *Pseudomonas alcaligenes* using palm oil**. In: 2TH MERCOSUR CONGRESS ON CHEMICAL ENGINEERING (ENPROMER), Costa Verde – RJ, Brazil, 2005.

OSTERREICHER-CUNHA P, GUIMARÃES JRD, VARGAS JR EA, PAIS DA SILVA MI. Studies of biodegradation processes of BTEX-ethanol mixture in tropical soil. **Water Air Soil Poll**, v. 181, p.303–317, 2007.

PAIXÃO *et al.* Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: an approach to minimize environmental pollution risk. **Environmental Research**, v. 103, n.3, p. 365–374, 2007.

PARAMESWARAPPA, S.; KARIGAR, C.; NAGENAHALLI, M. Degradation of ethylbenzene by free and immobilized *Pseudomonas fluorescens*-CS2. **Biodegradation**. v. 19, p. 137-144, 2008.

PEDROZO, M. F. *et al.* **Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, Governo da Bahia, Secretaria do Planejamento, Ciência e Tecnologia, Salvador, p. 229, 2002.

PEREIRA, L. T. C.; LEMOS, J. L. S. **Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus Niger* e *Penicillium Corylophilum***. Disponível em: <http://www.scielo.com.br/>. Acesso em: jan. 2015.

PHELPS, C. D.; YOUNG, L. Y. Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. **Advances in Agronomy**, v. 70, p. 329–357, 2001.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, v.11, n.9, p.671-674, 1997.

RAIMUNDO, R. S.; RIZZO, A. C. L. Utilização de biorreatores no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. **X Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT**. 2002.

RAMOS, Usaldo. **Estudo da biodegradação de gasolina por bactérias presentes no solo da área de armazenamento e distribuição de combustíveis no município de Ribeirão Preto**. 2006. 108 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental - Mestrado) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006.

RESENDE, Alessandra Abrão. **Mecanismos gerais de degradação bacteriana dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX)**. 2007. Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

RIBEIRO, Rogers. **Recuperação de águas contaminadas com gasolina utilizando reatores de leito fixo**. 2005. 186f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2005

ROBERT, M. *et al.* Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnol. Letters**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 871-874, 1989.

ROBLEDO-ORTÍZ, J.R.; RAMÍREZ-ARREOLA, D.E.; PÉREZ-FONSECA, A.A.; GÓMEZ, C.; GONZÁLEZ-REYNOSO O.; RAMOS-QUIRARTE, J. Benzene, toluene, and o-xylene degradation by free and immobilized *P. putida* F1 of postconsumer agave-fiber/polymer foamed composites, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 539-46, 2011.

SABATÉ, J.; VINAS, M.; SOLANAS, A. M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 19-25, 2004.

SAJNA, K.V.; SUKUMARAN, R.K.; GOTTUMUKKALA, L.D.; PANDEY, A. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudomonas* sp. NII 08165 or its culture broth. **Bioresource Technology**, v.191, p. 133-139, 2015.

SANCHES, L. E. A. **Desativação de empreendimentos industriais: um estudo sobre o passivo ambiental**. 1998. Tese (Livre Docência) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1998.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F.J.; ESPUNY, M.J.; MARQUÉS, A.; TERUEL, J.A.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Aggregation behaviour of a rhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 307, p. 246-253, 2007.

SANTAANNA L.M., SEBASTIAN G.V., MENEZES E.P., ALVES T.L.M., SANTOS A. S., PEREIRA Jr. N., FREIRE D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, p.159-166, 2002.

SANTAELLA, S. T. *et al.* Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*, **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, p. 139-148, 2009.

SANTOS A.S., SAMPAIO A.P.W., VASQUEZ G.S., SANTAANNA L.M. PEREIRA Jr. N., FREIRE D.M.G. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Biochem Biotechnol.**, v.98, p.1025-1034, 2002.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon

supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v. 136, p.187–195, 2005.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**: Engenharia Bioquímica. Volume I, 1ª ed. São Paulo: Blucher, 2001.

SEGEL, I. H. **Enzyme Kinetics**: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: John Wiley & Sons, 1975.

SHAH, M.R.; NOBLE, R.D.; CLOUGH, D.E. Pervaporation–air stripping hybrid process for removal of VOCs from groundwater. **Journal of Membrane Science**, v. 241, n.2, p. 257-263, 2004.

SHALABY, M. EL-S. A. EL-H. **Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by Burkholderia cepacia G4**. 2003. 143p. Thesis (Title of PhD) – Biochemical Engineering Division GBF, Alemanha, 2003.

SHIM, H.; HWANG, B.; LEE S.-S., KONG S.-H. Kinetics of biodegradation of BTEX by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. **Biodegradation**, v. 16, p. 319-327, 2005.

SHIM, H.; SHIN, E.; YANG, S. A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 203-216, 2002.

SHIM, H.; YANG, S.-T. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrousbed bioreactor. **J Biotechnol**, v.67, n.2-3, p. 99-112, 1999.

SILVA, Syllós. **Análise dos processos de flotação e oxidação avançada para o tratamento de efluente modelo da indústria de petróleo**. 2010. 86f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Engenharia Química – Mestrado) – Universidade do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

SILVA, R. L. B. *et al.* Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública Rio de Janeiro**, v. 18, n.6, p. 1599-1607, 2002.

SIM, L.; WARD, O.P.; LI, Z.Y. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 19, p. 232-238, 1997.

SINGH, R.; CELIN, S.M. Biodegradation of BTEX (benzene, toluene, ethyl benzene and xylene) compounds by bacterial strain under aerobic conditions, **Journal of Ecobiotechnology**, v. 2, p. 27–32, 2010.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, v.2, 1996.

SOUZA, A. L. S.; FURTADO, C. J. A. Reinjeção de água produzida na Petrobrás: perspectivas e desafios. **Boletim técnico da produção de petróleo**, v. 1, n. 2, p. 215-231, 2006.

SOUSA, J. R.; CORREIA, J. A. C.; ALMEIDA, J. G. L.; RODRIGUES, S.; PESSOA, O. D. L.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1831-1839, 2011.

SOUSA, O. L. *et al.* Tratamento biológico de águas residuárias de indústria petroquímica através de reatores aeróbios inoculados com *Cândida* sp. In: Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos. **Anais**. Recife: Editora Universitária da UFPE, p. 149-166, 2006.

SPIELMAN, L.A. & SU, Y.P. Coalescence of oil-in-water suspensions by flow through porous media, **Industrial. Engineering & Chemical Fundamentals**, v. 16, n. 2, p. 272-282, 1977.

SPILBORGHES, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto**. 1997. 147f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997.

STEWART, M.; ARNOLD, K. **Produced Water Treatment Field Manual**. Part 1 - Produced Water Treating Systems, p. 1-134, 2011.

STEPHENSON, M. T. Components of produced water: a compilation of industry studies. **Journal of Petroleum Technology**, v. 44 p. 548-603, 1992.

STOKSTAD, E. Factory study shows low levels of benzene reduce blood cell counts. **Science**, v. 306, p. 1665, 2004.

THOMAS, J. E. (Org). **Fundamentos de Engenharia de Petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência, PETROBRAS, 2001.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTX e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 441-446, 2004.

TRIGUEROS, D.E.G.; MÓDENES, A.N.; KROUMOV, A.D. ESPINOZA-QUINONES, F.R. Modeling of biodegradation process of BTEX compounds: kinetic parameters estimation by using particle Swarm global optimizer, **Process Biochemistry**, v.45, p.1355–1361, 2010.

TRIGUEROS, D. E. G. **Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos: benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e fenol**. 2008. 157 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo. 2008.

TRINDADE, P.V.O.; L.G. SOBRAL, A.C.L.; RIZZO, S.G.F.; LEITE, A.U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. **Chemosphere**, v.58, p.515–522, 2005.

TROVÃO, Renata. **Análise ambiental de solos e águas subterrâneas contaminadas com gasolina: Estudo de caso do Município de Guarulhos-SP**. 2006. 157 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologias – Mestrado e Doutorado) – Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TUMMELER, K.; EFFENBERG, F.; SYLDATK, C. Na integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp. DSM 2874. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 105, p. 563-571, 2003.

VIDAL, Carla Bastos Vidal. **Remoção de BTEX em solução aquosa por adsorção usando zeólita sintética modificada**. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

VIDALI, M. Bioremediation an overview. **Pure and applied chemistry**, v. 73, n.7, p. 1163–1172, 2001.

VITOLO, M.; DURANTI, M.A.; PELLEGRIM, M.B. Effect of pH, aeration and sucrose feeding on the invertase activity of intact *S. cerevisiae* cells grown in sugarcane blackstrap molasses. **J. Ind. Microbiol.**, Amsterdam, v. 15, p. 75-79, 1995.

YANG, H.; JIANG, Z.; SHI S. Aromatic compounds biodegradation under anaerobic conditions and their QSBR models. **Science of the Total Environment**, v. 358, p. 265-276, 2006.

YOON, H.; KLINZING, G.; BLANCH, H. W. Competition for mixed substrates by microbial populations. **Biotechnol Bioeng**, v. 19, p. 1193-1210, 1977.

WEI Y. H.; CHOU C. L.; CHANG J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

ZHAO, DONGFENG; LIU, CHUNSHUANG; LIU, LIHONG; ZHANG, YUNBO; LIU, QIYOU; WEI-MIN WU. Selection of functional consortium for crude oil contaminated soil remediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 1244–1248, 2011.

ZHANG, G.; WU, Y.; QIAN, X.; MENG, Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, Hangzhou, v. 6B, n.8, p.725-730, 2005.

ZILOUEI, H. *et al.* Biological degradation of chlorophenols in packed-bed bioreactors Using Mixed Bacterial Consortia. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1083-1089, 2006.

ANEXOS

ANEXOS

Tabela 19: Dados experimentais para concentração inicial de 50 mg/L de tolueno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	51.58	0.96	15.00	1.41	0.00	0.00
0.25	42.59	2.04	23.00	1.41	0.74	0.03
0.50	31.58	1.32	39.50	0.71	1.13	0.11
0.75	21.20	0.92	47.00	1.41	3.01	0.07
1.00	5.65	1.36	65.50	0.71	4.37	0.16
1.25	2.64	0.08	67.00	1.41	4.72	0.10
1.50	0.00	0.00	67.50	0.71	4.73	0.08

Tabela 20: Dados experimentais para concentração inicial de 80 mg/L de tolueno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	78.53	1.27	14.00	1.41	0.00	0.00
0.25	72.97	0.61	19.50	0.71	0.59	0.10
0.50	62.86	1.36	30.50	0.71	1.67	0.11
0.75	51.55	2.05	39.00	1.41	2.70	0.42
1.00	38.05	0.16	52.50	0.71	4.02	0.30
1.25	32.20	1.50	66.00	1.41	5.71	0.52
1.50	13.25	0.54	75.50	0.71	6.38	0.37
1.75	6.54	0.31	83.50	0.71	7.32	0.28
2.00	3.56	0.20	86.50	0.71	7.55	0.34
2.25	2.64	0.03	88.50	0.71	7.80	0.42

Tabela 21: Dados experimentais para concentração inicial de 100 mg/L de tolueno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	100.50	0.89	14.50	0.71	0.00	0.00
0.25	92.07	0.91	27.50	0.71	0.60	0.21
0.50	86.51	2.71	31.50	0.71	2.10	0.42
0.75	66.88	2.24	38.50	0.71	2.90	0.28
1.00	57.50	4.66	59.50	0.71	5.21	0.07
1.25	35.56	2.03	79.50	0.71	6.32	0.21
1.50	21.25	0.20	95.00	1.41	8.92	0.40
1.75	11.27	0.35	99.50	0.71	9.27	0.31
2.00	3.68	0.04	103.00	1.41	9.85	0.17
2.25	2.73	0.26	107.00	1.41	10.40	0.11

Tabela 22: Dados experimentais para concentração inicial de 120 mg/L de tolueno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	120.55	1.82	14.50	1.41	0.00	0.00
0.25	111.95	0.59	29.50	0.71	1.02	0.04
0.50	100.64	5.36	34.00	1.41	3.01	0.08
0.75	76.20	0.38	50.00	1.41	5.20	0.16
1.00	64.78	2.36	75.50	0.71	6.24	0.28
1.25	40.71	1.64	96.50	0.71	11.40	0.57
1.50	23.92	0.84	99.50	0.71	12.01	0.30
1.75	12.62	0.51	117.00	1.41	14.03	0.47
2.00	6.30	0.20	125.00	1.41	14.50	0.57
2.25	2.56	0.03	125.00	1.41	15.10	0.42

Tabela 23: Dados experimentais para concentração inicial de 170 mg/L de tolueno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	170.17	4.18	15.00	1.41	0.00	0.00
0.25	163.08	3.00	31.50	0.71	2.02	0.18
0.50	140.44	4.27	38.50	0.71	4.78	0.21
0.75	110.03	6.81	75.50	0.71	8.57	0.08
1.00	94.99	5.24	87.50	0.71	14.30	0.18
1.25	60.55	4.74	110.00	1.41	19.02	0.08
1.50	32.76	4.42	152.00	1.41	21.20	0.23
1.75	16.01	3.43	161.00	1.41	26.67	0.21
2.00	5.96	1.10	174.00	1.41	29.01	0.17
2.25	4.45	0.85	175.00	1.41	29.27	0.21
2.50	0.73	0.33	176.00	1.41	29.53	0.17

Tabela 24: Dados experimentais para concentração inicial de 40 mg/L de etilbenzeno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	44.04	2.87	14.50	0.71	0.00	0.00
0.25	38.93	2.38	17.00	1.41	0.32	0.04
0.50	29.85	0.41	30.50	0.71	1.02	0.06
0.75	20.12	0.75	37.00	1.41	2.1	0.28
1.00	12.02	0.45	52.50	0.71	2.89	0.08
1.25	4.29	0.27	55.00	1.41	3.25	0.08
1.50	1.20	0.33	61.00	1.41	3.51	0.04
1.75	0.00	0.00	61.50	0.71	3.67	0.07

Tabela 25: Dados experimentais para concentração inicial de 60 mg/L de etilbenzeno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	60.24	0.81	15.00	1.41	0.00	0.00
0.25	53.42	0.57	20.50	0.71	0.59	0.14
0.50	44.49	1.25	37.00	1.41	1.55	0.11
0.75	32.92	1.31	40.00	1.41	2.43	0.08
1.00	20.49	0.02	59.50	0.71	3.92	0.10
1.25	10.44	0.17	64.50	0.71	4.68	0.08
1.50	3.62	0.26	72.00	1.41	5.41	0.08
1.75	1.65	0.35	76.00	1.41	5.64	0.10
2.00	0.00	0.00	76.50	0.71	5.79	0.07

Tabela 26: Dados experimentais para concentração inicial de 80 mg/L de etilbenzeno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	77.48	5.14	15.00	1.41	0.00	0.00
0.25	74.31	1.90	21.50	0.71	0.60	0.14
0.50	64.27	6.28	35.50	0.71	1.50	0.14
0.75	50.95	5.99	45.50	0.71	3.70	0.28
1.00	29.60	1.10	61.50	0.71	5.20	0.14
1.25	14.89	0.88	80.00	1.41	6.20	0.25
1.50	4.08	0.19	89.00	1.41	6.90	0.42
1.75	3.15	0.06	91.00	1.41	7.10	0.13
2.00	2.73	0.04	92.00	1.41	7.50	0.28
2.25	2.68	0.04	92.50	0.71	7.70	0.28

Tabela 27: Dados experimentais para concentração inicial de 120 mg/L de etilbenzeno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	122.70	8.58	15.50	0.71	0.00	0.00
0.25	111.95	1.19	17.50	0.71	1.26	0.07
0.50	105.40	6.60	47.50	0.71	2.12	0.20
0.75	87.64	1.62	53.00	1.41	4.67	0.20
1.00	56.49	4.69	68.50	0.71	6.39	0.24
1.25	35.64	0.26	98.50	0.71	9.74	0.21
1.50	18.66	5.46	106.00	1.41	11.13	0.16
1.75	10.40	0.54	122.00	1.41	12.74	0.18
2.00	3.88	1.01	126.00	1.41	13.57	0.04
2.25	1.34	1.89	127.00	1.41	13.64	0.04

Tabela 28: Dados experimentais para concentração inicial de 150 mg/L de etilbenzeno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	147.89	2.52	15.50	0.71	0.00	0.00
0.25	139.24	1.99	18.50	0.71	0.96	0.13
0.50	130.70	3.94	27.50	0.71	2.34	0.28
0.75	120.32	0.31	57.50	0.71	4.87	0.14
1.00	102.21	0.65	61.50	0.71	7.21	0.21
1.25	69.61	1.11	84.50	0.71	9.42	0.04
1.50	46.40	0.87	100.00	1.41	14.26	0.28
1.75	30.32	2.90	127.00	1.41	14.81	0.21
2.00	16.25	0.87	130.00	1.41	15.88	0.21
2.25	9.69	0.04	135.00	1.41	16.90	0.14
2.50	3.20	0.01	139.00	1.41	17.62	0.14

Tabela 29: Dados experimentais para concentração inicial de 50 mg/L de benzeno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	50.22	1.26	15.00	1.41	0.00	0.00
0.25	42.31	0.15	18.00	1.41	0.75	0.14
0.50	35.89	0.78	33.50	0.71	1.89	0.34
0.75	27.92	0.58	39.00	1.41	2.74	0.28
1.00	10.35	0.02	56.00	1.41	4.36	0.34
1.25	7.82	0.33	59.00	1.41	5.35	0.13
1.50	6.65	0.17	65.00	1.41	5.67	0.41
1.75	0.00	0.00	67.00	1.41	6.20	0.57

Tabela 30: Dados experimentais para concentração inicial de 80 mg/L de benzeno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	81.84	1.63	15.00	1.41	0.00	0.00
0.25	78.95	0.26	18.50	0.71	0.89	0.31
0.50	64.58	1.54	35.50	0.71	2.62	0.48
0.75	50.00	0.60	42.00	1.41	3.63	0.72
1.00	36.09	1.28	59.50	0.71	6.97	0.44
1.25	23.08	0.67	70.50	0.71	7.80	0.44
1.50	17.59	0.45	81.50	0.71	9.30	0.54
1.75	8.54	0.58	90.00	1.41	10.51	0.23
2.00	5.97	0.01	93.00	1.41	10.89	0.31
2.25	1.34	1.89	94.50	0.71	11.19	0.27

Tabela 31: Dados experimentais para concentração inicial de 120 mg/L de benzeno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	121.44	3.13	15.50	0.71	0.00	0.00
0.25	111.13	1.01	18.50	0.71	2.11	0.18
0.50	99.20	0.40	41.50	0.71	4.97	0.43
0.75	85.26	1.52	62.00	1.41	7.85	0.14
1.00	64.38	3.73	81.50	0.71	10.36	0.35
1.25	41.79	0.61	95.50	0.71	13.52	0.69
1.50	10.69	0.48	123.00	1.41	16.27	0.37
1.75	7.22	0.12	127.00	1.41	17.42	0.30
2.00	0.00	0.00	131.00	1.41	18.10	0.24
2.25	0.00	0.00	133.00	1.41	18.34	0.40

Tabela 32: Dados experimentais para concentração inicial de 160 mg/L de benzeno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	161.88	1.64	15.50	0.71	0.00	0.00
0.25	158.20	4.54	18.50	0.71	1.79	0.24
0.50	143.85	3.20	36.50	0.71	4.62	0.13
0.75	121.36	3.21	78.50	0.71	8.41	0.13
1.00	79.62	0.96	92.50	0.71	13.51	0.23
1.25	52.89	2.97	120.00	1.41	20.59	0.28
1.50	25.52	1.38	135.00	1.41	24.11	0.42
1.75	7.49	0.27	161.00	1.41	24.96	0.28
2.00	5.99	0.03	163.00	1.41	25.80	0.30
2.25	0.00	0.00	166.00	1.41	26.50	0.37

Tabela 33: Dados experimentais para concentração inicial de 200 mg/L de benzeno.

Tempo (h)	Concentração substrato (mg/L)	Desvio padrão	Concentração biomassa (mg/L)	Desvio padrão	Concentração produto (mg/L)	Desvio padrão
0.00	204.31	1.83	15.00	1.41	0.00	0.00
0.25	193.13	3.59	24.50	0.71	1.75	0.18
0.50	180.18	0.40	32.50	0.71	4.79	0.04
0.75	168.72	2.03	53.50	0.71	7.25	0.28
1.00	131.12	1.77	92.00	1.41	11.87	0.44
1.25	82.75	0.87	135.00	1.41	18.63	0.31
1.50	47.95	1.89	142.00	1.41	25.95	0.44
1.75	26.26	0.77	182.00	1.41	29.32	0.42
2.00	9.34	0.23	189.00	1.41	32.60	0.66
2.25	7.79	0.22	195.00	1.41	33.10	0.35
2.50	6.76	0.08	198.00	1.41	33.75	0.34