



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOQUÍMICA  
DO PETRÓLEO E MEIO AMBIENTE - POSPETRO**

**ODETE GONÇALVES**

**BIORREMEDIAÇÃO DE SUBSTRATO DE MANGUEZAL  
CONTAMINADO COM PETRÓLEO, ATRAVÉS DA ADIÇÃO DE  
NUTRIENTES (GLICERINA BRUTA E TORTA DE MAMONA) E  
FUNGOS *Aspergillus* spp ou *Penicillium* spp**

**SALVADOR**

**2012**

**ODETE GONÇALVES**

**BIORREMEDIAÇÃO DE SUBSTRATO DE MANGUEZAL  
CONTAMINADO COM PETRÓLEO, ATRAVÉS DA ADIÇÃO DE  
NUTRIENTES (GLICERINA BRUTA E TORTA DE MAMONA) E  
FUNGOS *Aspergillus spp* ou *Penicillium spp***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica do Petróleo e Meio Ambiente, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Montenegro Barbosa

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cristina Maria Assis Lopes Tavares da Mata Hermida Quintella

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Trigüis

**SALVADOR**

**2013**

"BIORREMEDIAÇÃO DE SUBSTRATO DE MANGUEZAL CONTAMINADO COM PETRÓLEO, ATRAVÉS DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES (GLICERINA BRUTA E TORTA DE MAMONA) E FUNGOS *Aspergillus Spp* ou *Penicillium Spp*".

por

**Odete Gonçalves**

(Licenciatura em Ciências Naturais, Universidade Federal da Bahia, - UFBA - 2009, Salvador - Bahia)

Orientador: **Prof. Dr. Ronaldo Montenegro Barbosa**

Co-Orientadora: **Profa. Dra. Cristina Maria Assis Lopes Tavares da Mata Hermida Quintella**

Co-orientador: **Prof. Dr. Jorge Alberto Triguis**

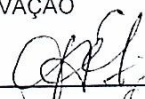
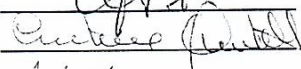
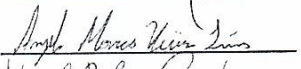
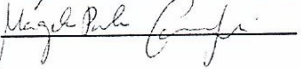
#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Submetida em satisfação parcial dos requisitos do grau de

**MESTRE EM GEOQUÍMICA DO PETRÓLEO E AMBIENTAL**

À Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal da Bahia

APROVAÇÃO

BANCA EXAMINADORA

*Prof. Dr. Ronaldo Montenegro Barbosa (UFBA)*

*Profa. Dra. Cristina Maria Assis Lopes Tavares da Mata Hermida Quintella (UFBA)*

*Prof. Dr. Ângelo Marcos Vieira Lima (FRB)*

*Profa. Dar. Magela Paula Casiraghi (UN-BA/ENGP/EIPA)*

Data da Defesa Pública: 22/08/2012

SALVADOR-BAHIA  
AGOSTO/2012

*"Dedico este trabalho às minhas filhas, Vastiane Evelise, Viviane Quênia, Cristiane Carla, Lilian Lucia, e aos meus netos, pelo apoio, carinho, amor e incentivo que me proporcionaram no decorrer desta caminhada ao despertar das potencialidades. Dedico ainda ao meu esposo e companheiro, pelo seu amor e compreensão, sentimentos elevados e um clima de harmonia, os quais contribuíram para incentivar o meu desempenho nos estudos".*

## AGRADECIMENTOS

Nesta oportunidade quero lembrar e agradecer a todos que contribuíram direta e indiretamente em todas as etapas da minha formação e agregaram valores para este estudo.

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por mostrar e abrir meus caminhos na ciência, por me permitir alcançar esta etapa, sempre acreditando, com muita fé.

Às minhas filhas, netos e genros, pelo carinho e aconchego recebido, os quais sempre estiveram ao meu lado, dando incentivo, proporcionando horas de laser, bem-estar, união e compromisso para um melhor desempenho.

Ao meu esposo, Zenóbio, companheiro de todas as horas, pelo apoio recebido e por ter me dado amor e carinho nas horas de desafios.

Ao meu orientador, Dr. Ronaldo Montenegro Barbosa pela sua atenção dispensada ao discutirmos as etapas do trabalho, dentro da sua visão na prática de pesquisador.

A minha co-orientadora Dra. Cristina Quintella, uma verdadeira mestra e amiga, muito dinâmica, dotada de sabedoria e ciência, que acreditou no meu potencial em pesquisa. E por sua luta incessante pela divulgação e ampliação da Inovação, Ciência e Tecnologia, dando oportunidades valiosas no registro da transmissão de conhecimentos.

Ao meu co-orientador Dr. Jorge Alberto Trigüis, grande pesquisador em Geoquímica orgânica, por me permitir construir conhecimentos em sistemas petrolíferos.

Ao curso e professores do Pospetro, Pós-Graduação Geoquímica do Petróleo e Meio Ambiente/UFBA pela oportunidade e conhecimentos transmitidos, para este estudo.

Ao professor Ernande Melo de Oliveira, pela contribuição nas análises de Difractometria de Raios-X, GQ-UFBA, à Pérola por análise em Microscópio Eletrônico, contribuindo para o direcionamento à minha pesquisa com os novos produtos adquiridos, sucesso a todos.

À equipe do laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas FFAR-UFBA, à professora Dr<sup>a</sup> Tânia Barros na realização das análises microbiológicas deste trabalho.

Ao Laboratório de Coordenação IQ-UFBA, ao Dr. Fábio Boro pelas análises de Espectroscopia de Infravermelho para o biopolímero e cristais protéicos.

Ao Laboratório do Dep. Análises Bromatológicas (UFBA), a Dr<sup>a</sup> Mara Miranda pela realização das análises de Toxicologia em Aflatoxina.

A toda equipe LabLaser, a Arlete pelas análises em XRF, aos amigos e companheiros de pesquisa que contribuíram para o aprendizado que construímos juntos, um abraço.

A todos os companheiros, funcionários e técnicos do NEA, ao Laboratório de Campo, LEPETRO, a Sarah Adriana, pelo estudo em Cromatografia, meu carinho pela força.

À Petrobras e ao CNPQ pelo apoio financeiro e por acreditar no projeto.

## Resumo

O presente trabalho avalia o processo e produto do uso de uma Mistura Microbiológica para a biorremediação de manguezais contaminados por petróleo, apresentando os melhores desempenhos com o bioestímulo torta de mamona e a bioaumentação fungo *Aspergillus* spp (flavus), comparados com o fertilizante NPK e fungo o *Penicillium* spp. A metodologia foi originalmente desenvolvida e patenteada para a biorremediação de sedimentos contaminados de petróleo da bacia sedimentar do Recôncavo Baiano. O mecanismo da biorremediação inicia-se com as proteínas vegetais armazenadas e com o processo de hidrólise da cisteína da ricina (uma metalo-protease), devido à síntese microbiana de transformar e retirar da mistura o oxigênio e nutrientes energéticos para sua proliferação pela geração de energia celular. A mistura é composta de glicerina bruta de mamona, torta de mamona, petróleo, areia calcinada, água salina e fungos e sua eficiência é comprovada por técnicas de XRF e cromatografia gasosa. São discutidos o procedimento e a validação da biorremediação através das técnicas de XRF, cromatografia gasosa e infravermelho. Os subprodutos da biorremediação são um biopolímero (identificado como FUNAMIDA) e um Cristal Proteico de Amida que são caracterizados quimicamente através das técnicas de XRF, cromatografia gasosa, infravermelho e difratometria de Raios-X. Esses sub-produtos podem ser vistos como novos materiais com potenciais empregos apontados para a indústria de implantes biomédicos, biossensores e eletrônica, uma vez que extrai elementos-chave como Ti e Ru. Dessa forma, sugere-se que a metodologia aqui descrita seja empregada para a área de biotecnologia, a qual irá direcionar o uso dos novos materiais sintetizados para suas devidas aplicações nos segmentos tecnológicos específicos.

**Palavras-chave:** Biorremediação. Bioestímulo. Bioaumentação. Biopolímero. Mamona. Fungo. Amida.

## Abstract

The present study evaluates the process and product of a Microbial Mixture usage for bioremediation of petroleum contaminated wetlands, pointing the best performances for castor bean as biostimulation and fungus *Aspergillus* (flavus) as bioaugmentation, compared with NPK fertilizer and fungus *Penicillium* spp. The methodology was originally developed and patented for the bioremediation of oil contaminated sediments of the sedimentary basin of the Recôncavo. The mechanism of bioremediation begins with vegetable proteins stored and the process of hydrolysis of the cysteine of ricin (a metallo-protease), due to the microbial synthesis. The mixture is composed of crude glycerin castor oil, triturate castor oil, oil, sand, ash, salt water and fungi and their efficiency is proven by XRF techniques and gas chromatography. We discuss the procedure and the validation of bioremediation through the XRF techniques, gas chromatography and infrared. The byproducts of bioremediation are a biopolymer (labeled FUNAMIDA) and a Crystal Protein Amide which are chemically characterized by the techniques XRF, gas chromatography, IR and X-ray diffraction. These sub-products can be viewed as new materials with potential applications pointed to biomedical implants, biosensors and electronics industries, since it extracts key elements such as Ti and Ru. Thus, it is suggested that the methodology described here can be employed on biotechnology area, which will direct the use of new materials synthesized due to their technological applications in specific segments.

**Keywords:** Bioremediation. Biostimulation. Bioaugmentation. Biopolymer. Castor. Fungi. Amida.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
1. 1 OBJETIVOS .....	9
1. 1. 1 Objetivo Geral .....	9
1. 1. 2 Objetivos Específicos .....	9
1. 2 MICROORGANISMOS NA BIORREMEDIAÇÃO .....	10
1. 2. 1 Processos de biodegradação do petróleo por bactérias e fungos .....	12
1. 2. 2 Biorremediação por fungos .....	12
1. 2. 3 Bioestímulo fertilizante NPK e o vegetal <i>Ricinus communis</i> .....	14
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
2. 1 O EXPERIMENTO E O SÍTIO DE ESTUDO .....	16
2. 2 BIORREMEDIAÇÃO, BIOESTÍMULAÇÃO, BIOAUMENTAÇÃO .....	17
2. 2. 1 Caracterização dos Cristais Protéicos .....	20
2. 2. 2 Formação da Película Biopolímero durante a Biorremediação .....	20
2. 2. 3 Análise Microbiológica e Caracterização dos fungos .....	21
<b>3 RESULTADOS</b> .....	22
<b>4 ARTIGO 1</b> – Process and obtain biodegradable product for bioremediation of oil-impacted areas with a consortium of microorganisms’ co-products of a first generation of biodiesel .....	42
<b>5 ARTIGO 2</b> – Description of a bioremediation process using <i>Ricinus communis</i> and filamentous fungi and microbiological mixture .....	53
<b>6 ARTIGO 3</b> – Produção de biossensor derivado de componentes voláteis encontrados em manguezais contaminados com hidrocarbonetos .....	68
<b>7 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	81
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	85
<b>APÊNDICES</b> .....	92
<b>ANEXOS</b> .....	145



## 1 INTRODUÇÃO

A biorremediação é uma técnica cientificamente comprovada e ecologicamente correta que propõe a utilização de plantas e microrganismos no tratamento de rejeitos potencialmente tóxicos para reduzir sua toxicidade (ATLAS, 1995). Este processo, produzido pela ação de bactérias e fungos, é empregado pela descontaminação de ambientes impactados por petróleo. Rosa (2001) assevera que a biodegradação “[...] pode estar limitada à disponibilidade de nutrientes, composição e abundância das comunidades microbianas, salinidade, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e composição do óleo derramado” (ROSA, 2001, p. 2).

As contaminações com hidrocarbonetos do petróleo, por sua vez, são distúrbios que modificam o ambiente natural e sua capacidade de auto-renovação (QUINTELLA *et al.*, 2009). Neste sentido, vê-se que o benefício maior da aplicação da biorremediação, é a mineralização, obtendo como produto final CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pela via aeróbica, assim como formação de biomassa, segundo Cunha (1996).

Para Uña e Garcia (1983), a transformação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos pode ser facilitada pela produção de enzimas como catalisadores biológicos que controlam as reações bioquímicas, produzindo energia e material necessário para a proliferação de novas células microbianas. Os fungos produzem enzimas extracelulares oxidativas capazes de quebrar compostos de policíclicos aromáticos de cadeia longa e transformá-los em compostos assimiláveis ao seu metabolismo. Estas enzimas hidrolisam ligações peptídicas, quebrando-as, liberando peptídeos que são degradados a aminoácidos livres pelas peptidases (RODWELL, 2009). Importante salientar, que estudos indicam que ocorre o aumento da biodisponibilidade de policíclicos aromáticos (HPAs), aumento da taxa de solubilização dos metais pesados e aumento de solubilização de naftalenos pelo uso de biossurfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Um trabalho de biorremediação se efetiva com processos de óxido-redução e atinge os principais aspectos relativos à degradação e à mineralização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Tal processo acontece seguindo as etapas: Inicialmente, em fermentação, emitindo dispersão de gases (partículas menores). Em seguida, dá-se o efeito das emulsões, passando para a água as partículas solúveis com trocas iônicas e, finalmente, acontece, no substrato, as transformações físico-químicas produzidas pelos microrganismos para o seu metabolismo e assimilação.

## 1. 1 OBJETIVOS

### 1. 1. 1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o processo e os produtos do uso da Mistura Microbiológica para biorremediação de manguezais contaminados por petróleo, tendo a glicerina bruta e torta de mamona como bioestimulação e os fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp como bioaugmentação.

### 1. 1. 2 Objetivos Específicos

Para tal objetivo geral acontecer, elegemos os seguintes objetivos específicos:

- definir a melhor metodologia/tecnologia para utilização de biorremediação em regiões de manguezal (*artigo 1*);
- analisar a utilização dos subprodutos glicerina bruta e torta de mamona, e o fertilizante NPK (contendo nitrogênio fósforo e potássio), como bioestimulantes no processo de biorremediação pelos fungos no manguezal impactado com petróleo (*artigo 2*);
- avaliar a contribuição dos derivados da mamona (glicerina bruta e torta de mamona) e do fertilizante NPK como bioestímulos dos fungos para o desenvolvimento e proliferação fúngica através de análises de cromatografia (*artigo 2*);
- avaliar os resultados dos compostos orgânicos (hidrocarbonetos totais, hidrocarbonetos saturados, aromáticos e biomarcadores) com a bioestimulação dos fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, a fim de comprovar possível degradação de óleo no ambiente estudado;

Este trabalho justifica-se porque atende aos desafios da economia ao abrir portas para inovações orgânicas na ciência, gestão de negócios em biorremediação e desenvolvimento sustentável no plantio do campo e responsabilidade social com emprego e renda. Atende aos desafios tecnológicos ambientais, uma vez que a glicerina e torta de mamona, com o fungo anaeróbico facultativo, elaboram uma fermentação no sedimento argiloso do manguezal que favorece a aceleração da biorremediação natural.

## 1. 2 MICROORGANISMOS NA BIORREMEDIAÇÃO

A Agência de Proteção Ambiental estabelece como principais contaminantes do solo, em ordem crescente: cloroalifático, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, cloroaromáticos, aromáticos simples e outros. Muitos têm sua origem na industrialização do petróleo bruto, outros nas indústrias químicas e atividades agrícolas. No âmbito da biorremediação, os mais visados são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), os hidrocarbonetos halogenados, com os elementos Cloro, Bromo, são formadores de sal e ligações fortes com metais em geral iônicas. Estes são xenobióticos de grande persistência no solo, e os derivados nitrogenados do nitrotolueno (Agência de Proteção Ambiental dos EUA, combustíveis, EPA, petróleo, renováveis, Publicado em 10 de abril de 2012).

A microbiologia de degradação de hidrocarbonetos constitui um campo de pesquisa em pleno desenvolvimento. Tal interesse deve-se ao impacto que estes compostos podem causar no meio ambiente e à crescente utilização de procedimentos microbiológicos de descontaminação de solos, em razão de derramamento acidentais (BONAVENTURA; JOHNSON, 1997). O Enxofre contido nos compostos oleosos acelera os processos de biorremediação contribuindo para o metabolismo dos microorganismos (Apêndice A).

Ramos (2005), por sua vez, aponta que composição química do resíduo também determina a velocidade da biodegradação de petróleo bruto. A fração de compostos saturados do petróleo degrada-se mais facilmente do que a insaturada, exercendo grande influência no tratamento dos resíduos de refinarias.

Faz-se necessário destacar, ainda, que para alcançar o objetivo da biorremediação, é preciso o conhecimento das condições que influenciam o processo, dentre elas: característica do resíduo, presença de condições microbiológicas ótimas, a seleção correta da tecnologia de biorremediação e o uso de métodos analíticos apropriados para determinar o tipo e a extensão da contaminação (HUESEMANN, 1994 *apud* PEDROTI, 2007).

Dentre tantas formas de biorremediação, há as alternativas como a fitorremediação, que envolve o emprego de plantas para acelerar o processo de degradação. Estas contribuem através do efeito rizosférico sobre a microbiota biodegradadora (PRADHAN *et al.*, 1998).

A biorremediação envolve o processo de bioaugmentação, isto é, a inoculação do solo com culturas puras ou consórcio microbiano contendo microrganismos selecionados para degradações de contaminantes específicos. Esses processos têm sido bastante estudados para hidrocarbonetos clorados através do emprego de populações indígenas aclimatadas, isoladas e selecionadas (STRUTHERS *et al.*, 1998; BEWEY, 1996 *apud* RAMOS, 2005).

Os surfactantes são moléculas que possuem uma extremidade hidrofílica (água) e a outra hidrofóbica (oleofílica), podendo ser sintéticos, se obtidos a partir de sínteses químicas, ou biosurfactantes, quando produzidos por microrganismos (CASSIDY; HUDAK, 2001; CETESB, 2003). Já se encontra bem documentado a capacidade do biosurfactante de emulsionar misturas de hidrocarboneto e água. Tal propriedade envolve o aumento significativo de degradação dos hidrocarbonetos e, por isso, é utilizado na biorremediação de solos impactados e mananciais contaminados (LOBATO, 2000; CRAPEZ *et al.*, 2002).

O crescimento de microrganismos em uma interface de água e óleo favorece o aparecimento de um biofilme, no qual os microrganismos se aderem à superfície de grandes gotas de óleo devido à hidrofobicidade das células, passando a formar uma delgada interface, extraíndo os compostos insolúveis em água da fase oleosa e utilizando os sais minerais da fase aquosa. À medida que as células revestem as gotas de óleo produzindo biosurfactantes, reduz-se a tensão interfacial, o que favorece o crescimento e a colonização microbiana (ASCON-CABRERA; LEBEAULT, 1995 *apud* MARTINS, 2005).

Quanto à mamona, *Ricinus communis*, é uma fonte de energia para os microrganismos heterotróficos, modifica a atividade enzimática, além de favorecer a soimibilização de compostos minerais e inibir o efeito de algumas toxinas (TERRON, 1995 *apud* CAVALCANTI, 1998). A ricina é uma proteína inativadora de ribossomos (RIPs) do tipo II, heterodimérica, com a enzima inibidora de ribossomo (~32 KDa, cadeia A ou RTA) ligada por ponte dissulfeto a uma lectina galactose (~34KDa, cadeia B ou RTB). Já a cisteína é um aminoácido sulfurado, fonte de sulfato inorgânico, uma metalo-protease que usa um íon metal no seu mecanismo catalítico e hidrolisa as proteínas em aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células, uma vez que possui um papel despolimerizante (ALVAREZ-SANCHEZ *et al.*, 2000).

Dessa forma, a torta de mamona contém um elevado conteúdo protéico que a torna uma boa matéria-prima para a produção dos seguintes aminoácidos: arginina (11,0%), cistina (3,5%), fenilalanina (4,2%), histarina (11,0%), isoleucina (5,3%), leucina (7,3%), lisina (3,1%), metiolina (1,5%), tirosina (1,0%), treonina (3,6%), triptofano (0,6%) e valina (6,6%) (BELTRÃO, 2003).

Importante destacar que a distribuição de plantio da mamona para produção industrial em grandes áreas torna o meio ambiente verdejante, além de a fotossíntese contribuir para a mitigação da mudança climática global. Com o uso desse produto natural, biodegradável, inserido na indústria petrolífera com potencial energético e com disponibilidade em todo o Brasil, dá-se o exemplo de biotecnologia e auto-suficiência num país tropical.

### 1. 2. 1 Processos de biodegradação do petróleo por bactérias e fungos

Sabe-se que fungos e bactérias são os principais microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. Neste ínterim, Oliveira (2007) apresenta o emprego de esporos de *Bacillus subtilis* LAMI007 não patogênicos não modificados geneticamente, aprisionados em microesferas de quitosana para operações de biofertilização e biodegradação como biosurfactantes. Neste trabalho, propõe-se o emprego de esporos bacterianos, os quais ao serem empregados germinam, tornando-se ativos como biofertilizantes, biodegradadores e biorremediadores em ambientes naturais, domésticos e industriais.

Já Guiot e Tartakovsky (2007) apresentam um método para biorremediação de águas residuais, especialmente águas subterrâneas, por meio do emprego de tratamento biológico aeróbico e anaeróbico acoplado. Mais especificamente, o método contempla o uso de populações microbianas metanogênicas (estritamente anaeróbicas) e metanotróficas (estritamente aeróbicas) em combinação com um suprimento de oxigênio e hidrogênio dissolvidos em água *in situ*. A eletrólise da água é usada para produzir oxigênio e hidrogênio dissolvidos em água. A vantagem imediata do uso de H<sub>2</sub>O originária da eletrólise é o fornecimento de doadores de elétrons para metanógenos, objetivando desclorar redutivamente a cloroalifatia e reduzir os carbonatos na água, além de gerar metano, o qual é usado como fonte de energia e carbono para as bactérias metanotróficas. O oxigênio é usado como acceptor de elétrons pelas bactérias aeróbicas, incluindo as metanotróficas.

Leite *et al.*, (2005), por sua vez, apresentam um biorreator horizontal para processos *ex-situ* de biorremediação de solos argilosos contaminados com hidrocarbonetos e um processo de biorremediação de solos argilosos efetuado com auxílio do mesmo.

Já Fávero (2005), expõe uma técnica de adição de composto para bioaugmentação, biorremediação, bioproteção e bionibição. O produto é composto por bactérias e fungos que atuam de maneira a minimizar a produção de gases fétidos, acelerarem o processo de degradação de matéria orgânica e inibir o desenvolvimento de patogênicos e fitopatógenos por mecanismos de inibição, competição, exclusão competitiva, ou seja, disputa por substratos entre microrganismos benéficos, patogênicos e fitopatógenos.

### 1. 2. 2 Biorremediação por fungos

Retornando aos fungos, verifica-se que constituem um vasto grupo de organismos classificados como um reino denominado *Fungi*, pertencente ao domínio *Eukaryota*. Esse reino, de mais de um milhão e meio de espécies, algumas delas microscópicas, é ainda quase

desconhecido para a ciência e contribui de forma decisiva para a preservação da diversidade biológica do nosso planeta. Os fungos estão presentes de diversas formas no cotidiano. Possuem um corpo vegetativo chamado talo ou soma que é composto de finos filamentos unicelulares chamados hifas. Estas, geralmente, formam uma rede microscópica junto ao substrato (fonte de alimento), chamada micélio, por onde o alimento é absorvido. Os micélios podem ser cenocílico ou septado. A célula fúngica é uma estrutura similar a células animais, porém, com parede celular distinta (CLÉCIO, 2008).

Entre os microrganismos que podem ser utilizados para o tratamento biológico de derrames de petróleo, os fungos vêm se mostrando hábeis em degradar compostos xenobióticos e outros de grandes cadeias moleculares que, em geral, são de difícil degradação. Além do mais, os fungos sobrevivem e crescem em meios com concentração elevada de compostos recalcitrantes e são capazes de utilizá-los como fonte de energia (EGGEN; MAJCHERCZYK, 1998; ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006; SANTOS; LINARDI, 2004 *apud* SANTAELLA *et al.*, 2009).

Os fungos filamentosos são os mais eficientes na produção de enzimas extracelulares oxidativas, dentre elas proteases, celulasas, ligninasas e outras (EGGEN; MAJCHERCZYK, 1998 *apud* SANTAELLA *et al.*, 2009). Pelo processo das enzimas proteases, as partículas metálicas que as compõem se expõe em maior quantidade no meio aquoso salino, possibilitando um aumento de frações nanométricas que, ao se reagruparem, formam uma interação provocando a mineralização do substrato. Podem adaptar-se, ainda, às mais variadas concentrações de oxigênio, podendo utilizar tanto o oxigênio livre como o oxigênio combinado. Dependendo da concentração deste elemento no meio em que se encontram, utiliza-se de rotas metabólicas alternativas (desnitrificação e amonificação), além da respiração aeróbica convencional (TAKAYA, 2002). Os fungos podem apresentar-se como organismos unicelulares livres (leveduras), formar aglomerados (pseudomicélio) ou filamentos (micélio). A reprodução pode ser assexuada ou sexuada. Quanto aos nutrientes requeridos são os elementos C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe, Zn, além da luminosidade, a temperatura, a acidez e a umidade.

No que se refere ao fungo *Aspergillus fumigatus*, sabe-se que uma cepa foi isolada durante um programa de seleção de microrganismo do solo para que se realizasse uma caracterização inicial de suas enzimas extracelulares (PERALTA; DOMINGUES, 1993). Pode estar presente em diversos meios, é facultativamente anaeróbico, ou seja, pode atuar com ou sem presença do gás oxigênio, e resiste a uma ampla faixa de temperatura. Além do mais, este fungo tem sido apontado com potencial de degradação dos hidrocarbonetos de

petróleo com a atividade da produção microbiana (RAPER; FENNELL, 1999). Mariano (2006) assegura, também, que para algumas aplicações, a bioestimulação de microrganismos autóctones é a melhor escolha, considerando o custo e desempenho. É conhecido ainda que as proteínas surfactantes possam interagir com os antígenos glicosilados de *Aspergillus* spp, fungos filamentosos.

O *Penicillium* spp, por seu turno, é um gênero de fungos conhecido como o comum bolor do pão que cresce em matéria orgânica morta. Várias espécies produzem bactericidas (antibióticos) que permitem ao fungo lutar contra a competição feroz das bactérias saprófitas pelo alimento. Pitt (1985) e Cerniglia (1997) apontam a capacidade de degradação de hidrocarbonetos por estes fungos, uma vez que metabolizam os HAPs que possuem de dois a seis anéis aromáticos.

### **1. 2. 3 Bioestímulo fertilizante NPK e o vegetal *Ricinus communis*.**

Já o fertilizante NPK10-10-10 contém os principais macros nutrientes: nitrogênio, fósforo e potássio. Este é um fertilizante solúvel em água, formado na sua composição por fósforo monoamônico  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ , sulfato de amônia  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , cloreto de potássio (KCl) e farelo de algodão. Estes serão comparados com o vegetal *Ricinus communis* nas variáveis de bioestímulo para ambos os fungos.

Souza (2003) apontou que a biorremediação com a utilização de NPK, na proporção de 10% p/v do volume de óleo derramado, contribuiu para retirada de aproximadamente 30% dos alcanos; enquanto que a evaporação natural retirou aproximadamente 60% dos *n*-alcanos menores que *n*-C16 nos quatro primeiros dias da simulação, chegando a 80% após um mês.

Rosa (2001), em testes laboratoriais, também demonstrou boa eficiência do NPK como agente bioestimulador com relação a alguns dos seus componentes na limpeza de derrames de óleo. As ações decompositoras dos fungos removem resíduos terminais que são substituídos, ciclizados ou ligados por ligações isopeptídicas.

Com o intuito de reduzir o impacto ambiental causado com o descarte de efluentes contaminados com metais pesados, métodos alternativos, de baixo custo e eficientes têm sido desenvolvidos. Um deles é um processo químico de remediação em que ocorrem trocas iônicas entre duas ou mais fases cuja transferência de íons depende da eletroneutralidade regulada pela concentração dos íons nas fases (DAL BOSCO; JIMENEZ; CARVALHO, 2004). Neste processo, faz-se necessário uma investigação sobre a interação

sedimento/rocha/fluido nos mega processos provocados pelos microrganismos (Figura 01) que ocorrem na superfície do grão, estimulados na presença de traços de metais.

A oxidação química é empregada para decompor, reduzir ou eliminar a toxicidade dos contaminantes presentes, já que as reações de oxidação podem ocorrer naturalmente e são aceleradas mediante agentes oxidantes como  $O_3$ ,  $H_2O_2$  e persulfatos (CETESB, 2010). A redução química *in situ* envolve processos físico-químico-biológicos em sinergia criando condições redutivas extremas Eh (Potencial Redox) baixos, conforme Pujol (2009).

A mistura, composta alternadamente com torta de mamona e fertilizante NPK10-10-10, os fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, é utilizada para produzir surfactante, pois contém glicerina bruta, ácidos, ésteres, álcalis e álcoois, óleo, glicerídeos, água e sais variados.

Para a obtenção do processo de biorremediação pela ação de bactérias e fungos de áreas impactadas por petróleo serão observados e analisados os parâmetros:

- Fatores físico-químicos. —————> - Fatores biológicos
- Biorremediação por microorganismos
  - Bioestimulação – populações autóctones.
  - Bioaugmentação – introdução de microorganismos
- Monitoramento -————>
  - Avaliação em método
  - Baseado em isolamento e cultivo e Independente de cultivo.

**Figura 01:** Amostra de Mistura Microbiológica em processo de biorremediação





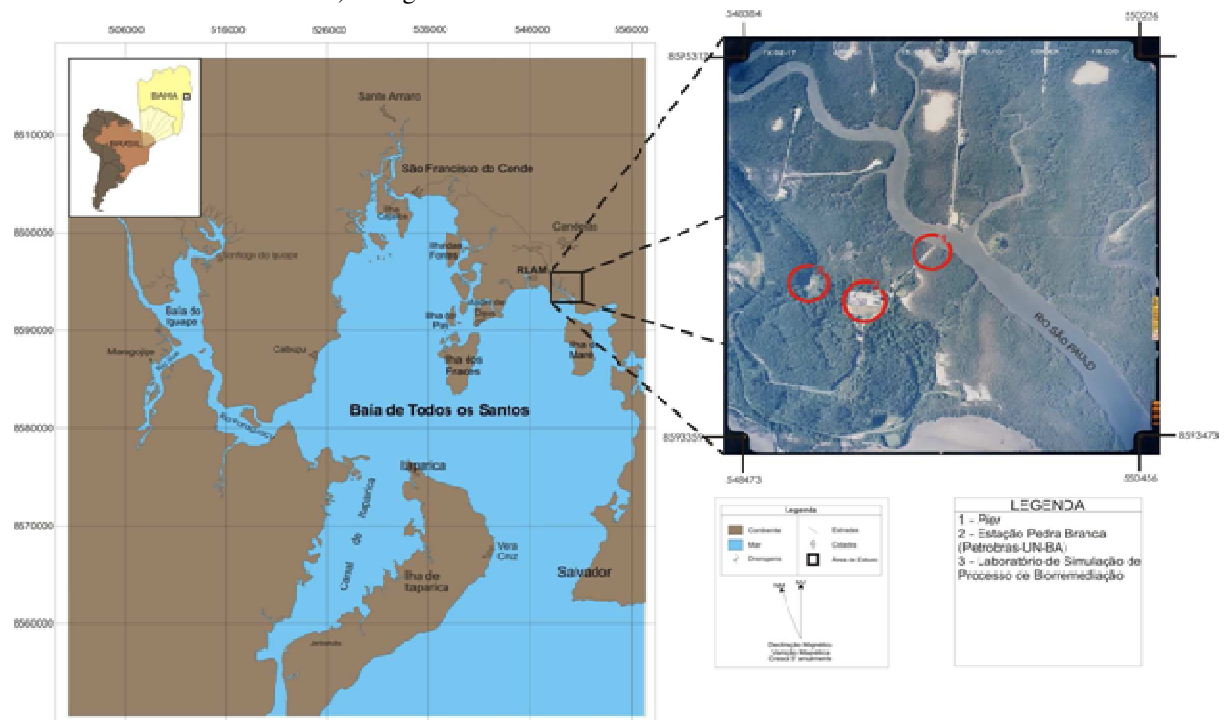
## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 O EXPERIMENTO E O SÍTIO DE ESTUDO.

Esta pesquisa foi desenvolvida no campo prático/experimental e teórico da Geoquímica Ambiental cujos estudos “preocupam-se, especialmente, com a qualidade de vida do homem e o equilíbrio antropocêntrico” (CARVALHO, 1989, p. 19), atentando para processos químicos e fontes atuais de desequilíbrio da natureza.

Realizou-se na unidade do laboratório de campo, nas proximidades do estuário do rio São Paulo. Esta unidade laboratorial, que se constitui como extensão do Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO), foi denominada “Laboratório de Simulação de Processos de Biorremediação” (LEPETRO - SIMULAÇÃO), e está localizado no município de Candeias, porção NW da Baía de Todos os Santos (Figura 02).

**Figura 02** – Mapa da Área de Estudo e Foto Localização. a) Mapa de Situação e Localização da Baía de Todos os Santos. b) Fotografia da área de coleta de sedimento.



Fonte: Adaptado de Bahia (2004).

Além dessa unidade, trabalhou-se no Núcleo de Estudos Ambientais (NEA) do Instituto de Geociências (IGEO/UFBA) em conjunto com o **LabLaser** - Laboratório de Cinética e Dinâmica Molecular do Instituto de Química (IQ/UFBA), os quais possuem infra-

estrutura adequada para a execução do projeto, como suporte na aplicação experimental científica.

Mais precisamente destaca-se (Figura 03) a área estudada, que está situada entre os municípios de Madre de Deus, Candeias e São Francisco do Conde, é representativa do Bioma Mata Atlântica, no ecossistema manguezal. No entanto, está exposta à possibilidade de acidentes oriundos da atividade petrolífera, encontra-se nas proximidades de zona de produção, refino e transporte da Refinaria Landulfo Alves – Mataripe (RLAM).

**Figura 03** – Área de estudo e foto de mapa de localização



Fonte: [www.google.maps.com](http://www.google.maps.com)

## 2. 2 BIORREMEDIAÇÃO, BIOESTIMULAÇÃO, BIOAUMENTAÇÃO

Em unidade de simulação, como inovação em biorremediação de manguezais contaminados com petróleo exsudado, foram utilizados, subprodutos da primeira geração de biocombustíveis, glicerina e torta de mamona como bioestímulo, sob a ação dos agentes de bioaumentação fungos *Aspergillus* spp, com predominância dos *Aspergillus flavus* e dos fungos *Penicillium* spp. Mais especificamente utilizou-se um consórcio com mamona e NPK, associados aos agentes, fungos no processo microbiológico, acelerado pela proteína vegetal inibidora ricina da mamona na fermentação alcoólica.

Inicialmente foi analisada a granulometria com centrifugação do sedimento manguezal coletado em campo contaminado e utilizado no experimental em aquários de campo.

## A) Semeadura

A confiabilidade no processo de validação de biorremediação foi reproduzida e verificaram-se nos dados reportados no *Capítulo 4*, garantindo sua comprovação. Foram separados os produtos e quantificados com adaptação equivalente à Patente de Invenção UFBA (QUINTELLA, GONÇALVES, 2010) nas proporções, encontra-se no Apêndice B. Houve também a comparação em outras unidades utilizando-se como padrão comercialmente disponível NPK fertilizante (Apêndice C).

No Apêndice D estão detalhadas a coleta do sedimento manguezal e a extração das alíquotas de hidrocarbonetos para análise de cromatografia líquida e gasosa. Foi utilizado liofilizador, macerado, peneirado para uso no extrator *soxhlet*. As semeaduras descritas e caracterizadas, tiveram seus produtos analisados com o acompanhamento das unidades de simulação, durante o período de 8 semanas, e seus parâmetros físico-químicos dos bioestímulos não conservativos como indicado no Apêndice E. Os parâmetros pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido foram mensurados com auxílio dos seguintes equipamentos:

- Refratômetro Hand Refractometer ATAGO modelo S/Mill-E;
- Condutivímetro Handylab 1, com precisão de 0,05 $\mu$ S.cm-1;
- pH-metro Handylab LF1, com precisão de 0,01 unidade de pH e/ou mVe;
- Oxímetro WTW OXI 3151, marca SCHOTT-GERATE, precisão de 0,01mg.L-1

Os parâmetros foram monitorados semanalmente no que apontam o comportamento do pH e Eh e influências químicas. Foi elaborada uma tabela com os dados dos parâmetros físicos observados durante todo o período da biorremediação; elaborou-se gráficos para maior compreensão do pH e do Eh da biorremediação; da salinidade e EH Mv, acompanhando assim também o comportamento gráfico da salinidade e condutividade.

Durante o período do experimento, o sedimento mostrou-se com cores estriadas, este fato levou a se fazer análise de toxicidade para Aflatoxina a fim de eliminar suspeitas de produção tóxica ao ambiente. Após análise, obteve-se resultado negativo, o que se demonstra visualmente é que são as etapas de transformações físico-químicas pelas quais passam as amostras durante o período de biorremediação. Atento ainda quanto às transformações, visualmente, pode-se observar larvas, pequenos Nematódeos, na biorremediação e até pequenos insetos voadores, o que caracteriza a matéria orgânica em abundância e existência de vida.

Inicialmente foram caracterizados os referenciais, branco que compõe a mistura microbiológica em cromatografia com extração dos hidrocarbonetos, alíquotas dos saturados, aromáticos e NOS, e feito Gráfico Ternário com o percentual encontrado.

Para obter a determinação de nitrogênio total foi utilizado o método volumétrico Micro-Kjeldahl, segundo os procedimentos descritos em BREMNER (1965). Utilizou-se de 0,7 g de amostra sedimento manguezal; 1,0 g de digestora (solução mistura); 3 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$  (C)). Estes foram colocados em tubo Kjeldahl homogeneizado na capela e adicionado o ácido sulfúrico. Logo após, colocou-os no bloco digestor à  $350^\circ C$  por 4 h ( $50-50^\circ$ ). Em seguida, a amostra foi colocada no extrator, digerida e deixada para esfriar na capela. Para melhor amostragem, foram feitas três amostras e tirada à média para se obter a quantidade da concentração para ser usada posteriormente nos bioestímulos NPK e torta de mamona. Houve também procedimento para a análise de fósforo no sedimento.

Para os inorgânicos foram feitas pastilhas com as amostras e analisadas em Fluorescência de Raios-X (XRF). Foram amostras do óleo total de todas as simulações nas 8 semanas, e nas alíquotas dos saturados dos *Aspergillus* spp este demonstrativo encontra-se no Apêndice F. Obtendo-se assim para cada semana 4 amostras, duas de bioaumentação com fungos e duas de bioestimulação com os nutrientes num total de 32 amostras.

Para a investigação orgânica dos hidrocarbonetos nas 8 semanas foram feitas as análises de cromatografia líquida e gasosa das amostras de *Aspergillus* spp com mamona, das alíquotas de saturados e aromáticos (Apêndice G). Também foram acompanhadas as prováveis alterações sofridas por compostos aromáticos alquilados (ROQUES; OVERTON; HENCY, 1994), utilizando o Cromatográfico a Gás (CG) Factor Four Variam 3900. Estes procedimentos fornecerão os perfis denominados *fingerprints*, que indicarão quais os compostos do óleo presentes e suas alterações à medida que os microrganismos degradem o contaminante.

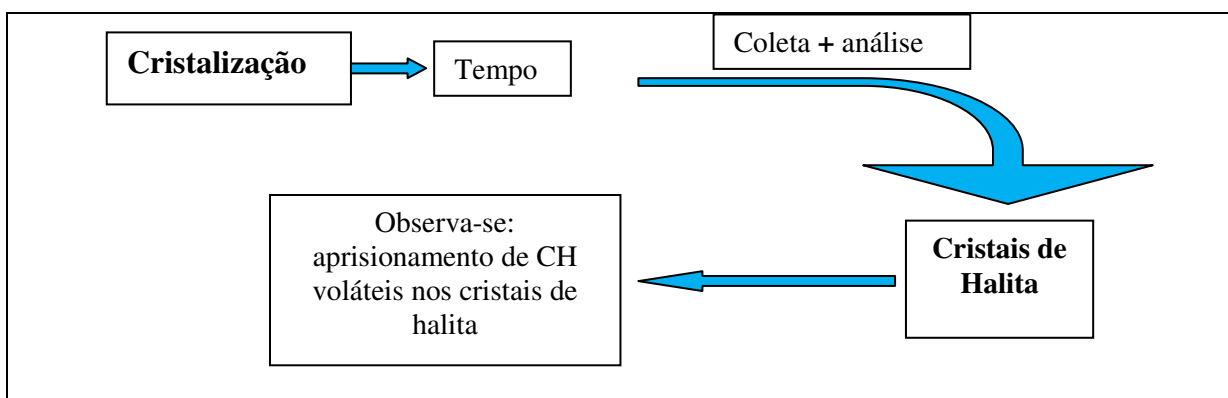
Após as análises foram obtidos os resultados dos cromatogramas dos fungos *Aspergillus* e mamona e dos *Aspergillus* e NPK e analisadas as comparações e normalização dos bioestímulos e bioaumentação, através de gráficos. Foi analisada também a comparação entre a biorremediação de fungos e de bactéria, comparação de cromatogramas de biorremediação de fungo *Aspergillus* com mamona 7 dias, e 60 dias e bactéria 60 dias. Ainda para uma melhor avaliação foi investigada a normalização da área total com *Aspergillus* e mamona; Normalização da área total com *Aspergillus* e NPK. Foi avaliada a degradação dos hidrocarbonetos cíclicos, fitano e pristano. Outra avaliação foi feita com o cálculo da quantidade de HTP/Kg, com bioestimulação mamona, NPK e bioaumentação com fungos, o

mesmo procedimento com fungos com mamona e NPK, na análise da quantidade de MCNR/Kg. Com os dados analíticos obtidos em cromatografia e XRF foi feita Análise Estatística de Componentes Variados, os quais indicam as transformações bioquímicas sofridas durante o processo de biorremediação no Gráfico de **loadings** com XRF.

## B) Processo de Cristalização na Biorremediação

Após a quantificação percentual de cada produto que compõe a mistura microbiológica equivalente à Patente de Inovação UFBA 2010, estes foram homogeneizados e colocados em placas de Petri fechadas. Estes procedimentos foram feitos por etapa, inicialmente a fim de serem repicadas as sementeiras nos aquários de experimental, protótipo de campo para biorremediação. Em segundo para serem observadas as reações bioquímicas, entre microorganismos (fungos) e as substâncias orgânicas e inorgânicas presente na mistura de hidrocarbonetos, sedimento e resina de mamona, além da presença da solução salina os quais são determinados pelo tempo (Figura 04) e volatilização para o processo de cristalização protéica.

**Figura 04:** Processo de cristalização na sementeira da biorremediação



### 3. 2. 1 Caracterização dos Cristais Protéicos

Sabe-se que o cristal Halita (NaCl) também é o responsável pelos compostos com ligação iônica. Para investigação dos possíveis elementos inorgânicos que estão contribuindo na biorremediação foi analisado de Fluorescência de Raios-X, e Difractometria de Raios-X. Para tal análise, selecionou-se os cristais em aparelho de Lupa Eletrônica, foram macerados e condicionados, obtendo-se o 7º resultado de XRF e 8º resultado, Difractometria de Raios-X.

Para comprovação foi realizada a semeadura 2 para comparação com o fator tempo, o antes e depois de 90 dias e analisado por Difractometria de Raio-X. Outra metodologia empregada foi para analisar o residual de produto microbiológico cristalizado em infravermelho. Fez-se pastilhas de boro, obtendo-se a origem orgânica do produto.

### **2. 2. 2 Formação de película, biopolímero durante a biorremediação**

Percebeu-se que, com 4 dias, a simulação com o fungo *Aspergillus* spp e o bioestímulo torta de mamona gerou, em cima da água, uma camada de emulsão oleosa, redução e mobilidade, que passou a ficar escura e turva. Com 15 dias, a solução apresentava-se muito escura, com fermentação de fungos e emulsão na superfície. Já com 34 dias, as substâncias que estavam emulsificadas formaram uma película biopolímeros, enquanto que a solução salina tornou-se de cor clara, sem espuma e com resíduo de sedimento no fundo. Provavelmente o biopolímero foi sintetizado pelo processo de transformação bioquímica e microbiológica dos fungos, para o seu metabolismo e assimilação. Este processo de polimerização residual foi analisado em infravermelho (*Capítulo 4*). Pode-se então fazer uma comparação entre os dois resultados de infravermelho, do biopolímero e do cristal protéico.

A composição inorgânica da membrana biopolímero foi investigada com base nos dados dos de XRF, comparando a produção dos fungos *Aspergillus* spp, seco e gelatinoso com amostras dos *Penicillium* spp , gelatinoso.

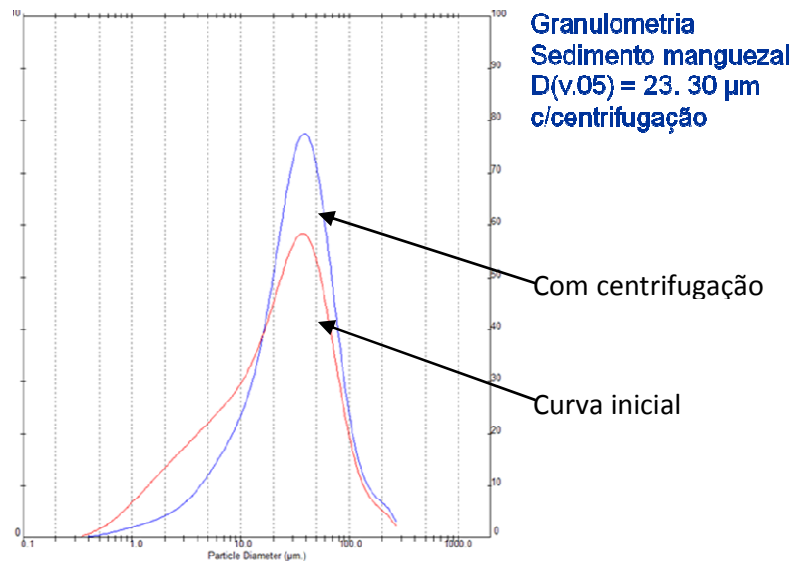
### **2. 2. 3 Análise Microbiológica e caracterização dos fungos durante o período de biorremediação**

As amostras colhidas no experimental do laboratório de campo foram enviadas ao Laboratório de Toxicologia de Farmácia da UFBA analisadas, com o objetivo de acompanhar, isolar e identificar os fungos adicionados e os já existentes no sedimento. No resultado Microbiológico obteve-se o Reino *Fungi*, do Filo *Ascomycota*, dos Gêneros *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp e espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*. Houve também os contaminantes *Mucor* spp e *Paecilomyces* spp. Como já foi apontado anteriormente, este trabalho utiliza como base as espécies *Aspergillus* spp, mais especificamente *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp.

### 3 RESULTADOS

Inicialmente foram caracterizados os produtos e substâncias que compõe a mistura microbiológica para comparação posterior com os resultados do processo de biorremediação. Assim sendo, foi analisada a granulometria com centrifugação (Figura 5) do sedimento manguezal coletado em campo contaminado.

**Figura 05 :** Perfil granulométrico com centrifugação com  $D(v.05) = 23.30\mu\text{m}$  do sedimento manguezal

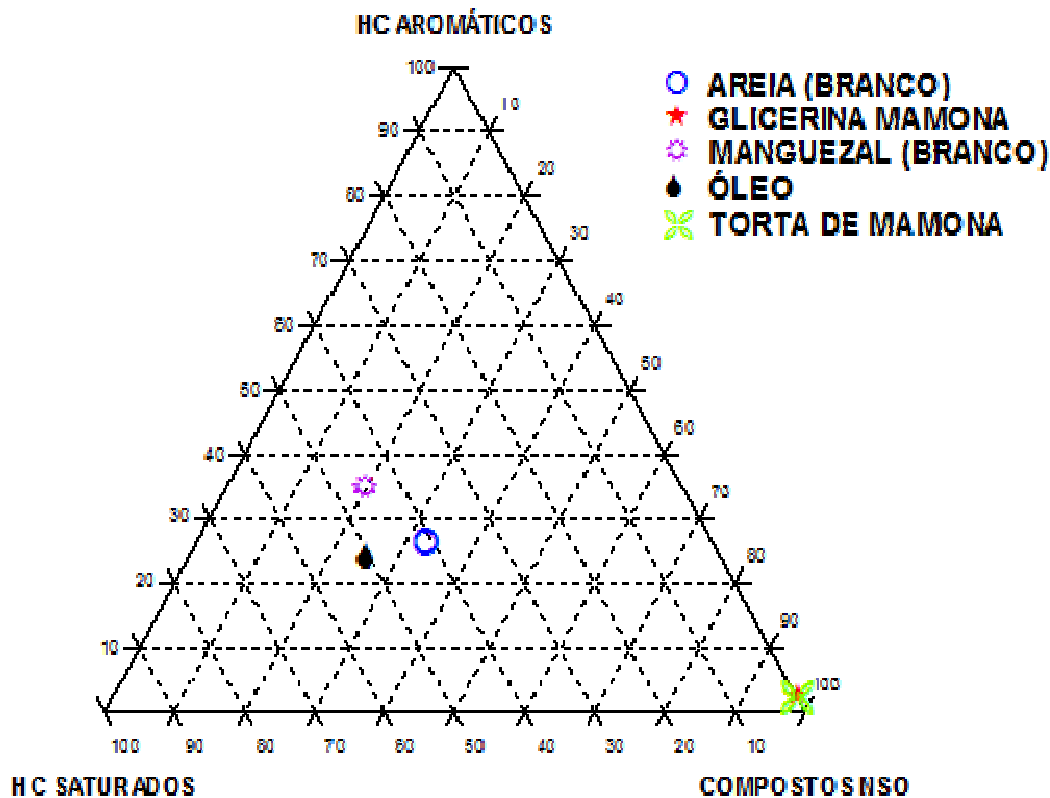


Foi obtido o perfil granulométrico inicial como curva aberta na lateral e menos intensa evidenciando ter ainda material a ser avaliado. Foi então acionada a centrifugação o que permitiu um pico mais vertical e elevado com o resultado de  $D(v.05) = 23.30\mu\text{m}$  com centrifugação para o sedimento manguezal.

Para caracterização dos componentes da **Mistura Microbiológica**, cada um foi analisado antes da fase experimental de campo em Cromatografia líquida, conforme mostra (Figura 6) apresentando o gráfico Ternário. Como resultado da extração das alíquotas de três frações de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e NSO, observa-se que existe uma concentração muito elevada, cerca de 97.7% dos compostos NOS (Tabela 01), oriundos da glicerina e torta de mamona, os quais irão contribuir para o aumento de MCNR/Kg.

**Tabela 01:** Tipo de amostras e alíquotas em %.

AMOSTRA (EXTRACTO ou ÓLEO)	HC SATURADOS %	HC AROMÁTICOS %	COMPOSTOS NSO %
AREIA (BRANCO)	41.2	26.5	32.4
GLICERINA MAMONA	0.0	2.3	97.7
MANGUEZAL (BRANCO)	45.2	35.0	19.8
ÓLEO	50.7	24.3	25.0
TORTA DE MAMONA	0.0	2.3	97.7

**Figura 06:**Gráfico Ternário com HC saturados, HC aromáticos e compostos NOS

Outro procedimento de investigação foi realizado como a análise de Nitrogênio total cujo resultado, obtido foi a concentração média de 0,16%, o que se convencionou que seria adicionado 10 g de NPK para cada amostra de simulação (Tabela 02).

**Tabela 02:** Nitrogênio total 3 amostras do sedimento manguezal para análise

Amostras	N(%)	N (%)	mg/mg	Media
Sedimento ref. 1	0.169	0.17	0.0017	0.00169
Sedimento ref. 2	0.158	0.16	0.0016	0.00158
Sedimento ref. 3	0.167	0.17	0.0017	0.00167

Como resultado das análises de Fosfato em três amostras de sedimento manguezal contaminado (Tabela 03), foram obtidos concentrações de 14.8 mg/Kg e 14.4 mg/Kg com uma média para as três amostras de sedimento branco de referência de 0.0144mg/Kg.



**Tabela 03:** Fósforo total 3 amostras de sedimento manguezal para análise

Amostras	C (mg/Kg)	Media (mg/g)
Sedimento ref. 1	14.8	
Sedimento ref. 1	14.8	0.0144
Sedimento ref. 1	14.4	

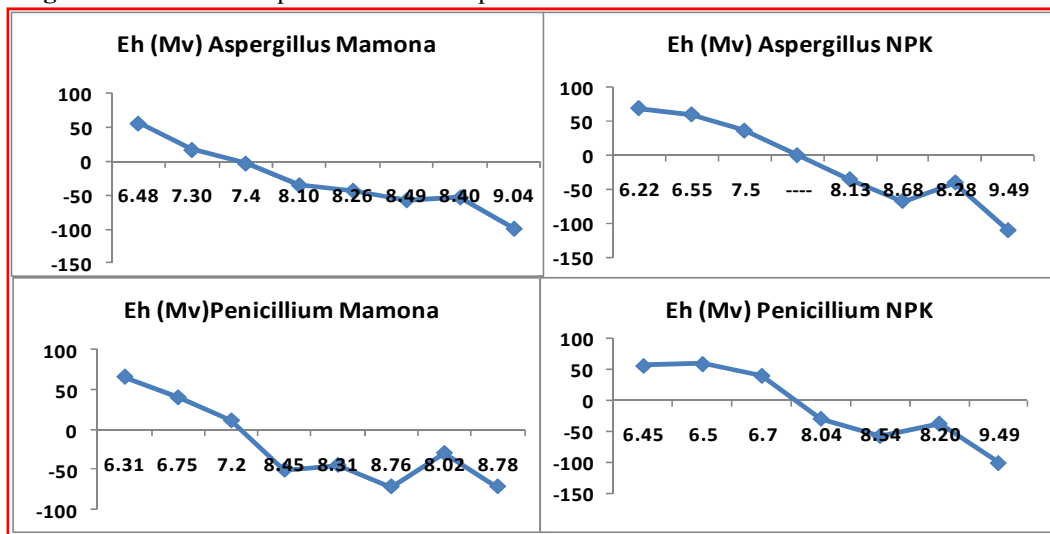
Durante as 8 semanas de experimental, em aquários, no laboratório de campo, foram tomados os parâmetros físico-químicos e organizados em uma tabela (tabela 04). Com esses resultados foram feitos gráficos do comportamento do pH e Eh o que as simulações evidenciam o aumento do ph e a diminuição do Eh, muito baixo criando condições redutivas, indicando a biorremediação nas transformaçõe bioquímicas

**Tabela 04 :** Parâmetros físico-químicos tomadas durante 8 semanas no processo de biorremediação

Simulação	Horário	Temp <sup>a</sup> .(°C)	pH	OD (mg/L)	Salinidade	Eh (Mv)	Condut ms/cm
1 Fungo Aspergillus NPK	10:46	28.6°	6.22	2.5	37	69	54.5
	10:45	28.5	6.55	3.0	40	60	71.7
	10:15	30.2	7.5	5.1	30	36	34.2
	11:10	----	----	----	----	----	----
	10:55	29.5	8.13	2.7	40	-35	79.8
	10:40	26.4	8.68	0.8	49	-67	84.4
	10:50	25.3	8.28	----	15	-40	33.0
	10:44	26	9.49	----	20	-110	----
2 Fungo Aspergillus Mamona	10:50	29.9	6.48	2.7	30	56	47.7
	10:50	27.7	7.30	4.8	27	17	57.3
	10:20	29.2	7.4	6.6	22	-3	49
	10:33	27.5	8.10	8.2	35	-35	58.4
	11:15	29.6	8.26	3.2	40	-43	75.2
	10:50	26.6	8.49	2.0	48	-57	84
	10:30	25.5	8.40	----	10	-53	30.6
	10:42	26	9.04	----	20	-99	----
3 Fungo Penicillium NPK	10:56	28.20	6.45	3.9	30	56	62.2
	10:22	29.8	6.5	1.4	29	59	22
	11:10	----	6.7	----	----	40	----
	10:55	30.2	8.04	3.4	41	-30	81.0
	10:20	26.9	8.54	1.0	51	-58	88.3
	10:35	25	8.20	----	6	-38	27.2
	10:45	26	9.49	-----	18	-102	----
	10:45	26	9.49	-----	18	-102	----
4 Fungo Penicillium Mamona	11:00	27.7	6.31	2.7	27	66	50.7
	11:10	27.7	6.75	3.6	25	40	53.1
	10:30	29.1	7.2	1.2	25	11	29
	10:50	27.5	8.45	8.5	30	-51	59.1
	10:55	29.4	8.31	4.2	36	-45	78.1
	11:10	26.9	8.76	2.8	50	-72	85.3
	10:40	24.4	8.02	----	6	-30	29.2
	10:47	26	8.78	----	20	-72	----

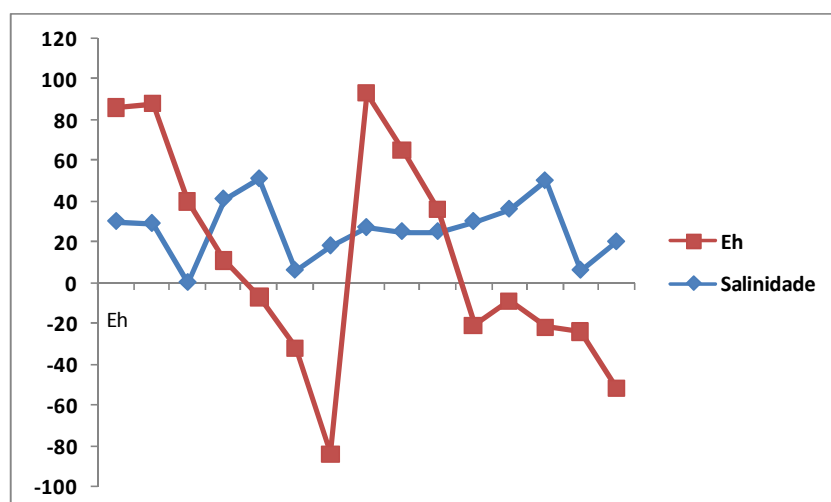
No início e no final, como indica na literatura, o pH se mostrou ácido, entretanto, durante o período de maior biorremediação se manteve neutro entre 7,5 e 8,0. O Eh iniciou com 56 (Mv) e acentuou-se com final mínimo de -99 o que evidencia o processo de biorremediação. Os dados relativos ao pH e potencial redox (Eh) (Figura 07) são parâmetros que devem ser observados nos sistemas marinhos ao aferir informações sobre as variações das condições ambientais geoquímicas e a respeito das tendências das degradações dos hidrocarbonetos.

**Figura 07:** Gráfico dos parâmetros físicos pH e Eh durante as 8 semanas evidenciando a biorremediação



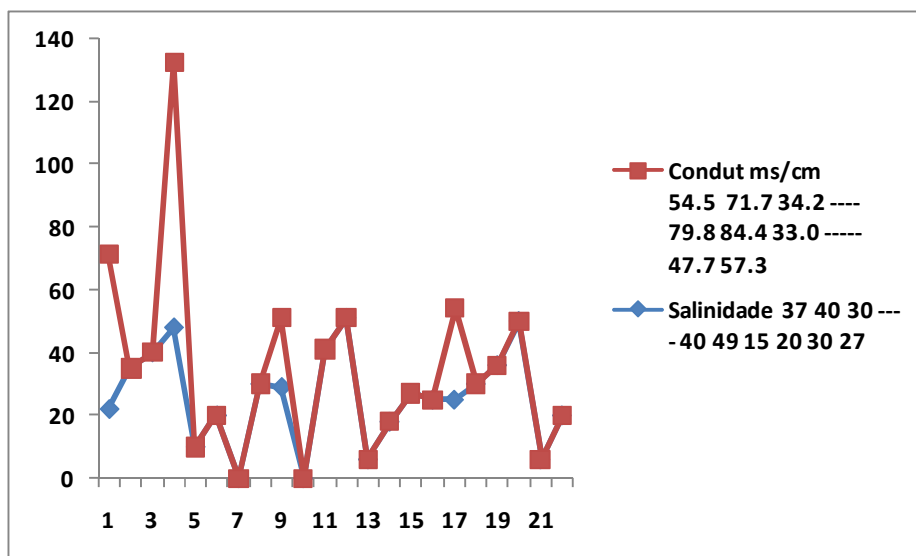
A fim de acompanhar as transformações bioquímicas foram feito gráficos de salinidade e Eh (Mv), observou-se que a cada duas semanas tem um pico de Eh (Mv) mais baixo, indicando a biorremediação, sendo que na última semana foi menos intenso com menor condição redutiva (Figura 08).

**Figura 08:** Parâmetros físico-químicos, salinidade e EH (Mv).



Acompanhando-se o desenvolvimento observa-se que: como a água salina dos aquários foi trocada a cada semana, inicialmente se mantinham com pouca salinidade aumentando gradativamente e acentuou-se nas amostras do fungo *Penicillium* na 6ª semana (Figura 09).

**Figura 09:** Gráfico dos parâmetros físico-químicos salinidade e condutividade durante as 8 semanas



Cada simulação do experimental foi caracterizado por Cromatografia líquida do óleo total obtendo-se, assim, os resultados apresentados no Tabela 05. Este detalha o tipo de amostra, número de hidrocarbonetos, quantidade de hidrocarboneto em mg por Kg de óleo, quantidade de mistura não resolvida em mg por Kg de óleo, quantidade de pristano em mg por Kg de óleo e quantidade em mg de fitano em mg por Kg de óleo.

De posse deste banco de dados específicos resultantes da biorremediação de manguezais contaminados, pode-se fazer várias modalidades de investigação observando o comportamento de cada componente e as transformações de suas substâncias para comprovação da biorremediação. Assim sendo pode-se concluir que houve ruptura total por fungos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, antraceno, fenantreno e pireno, como já foi atestado no *Artigo 01*, com formação de parafinas alifáticas,

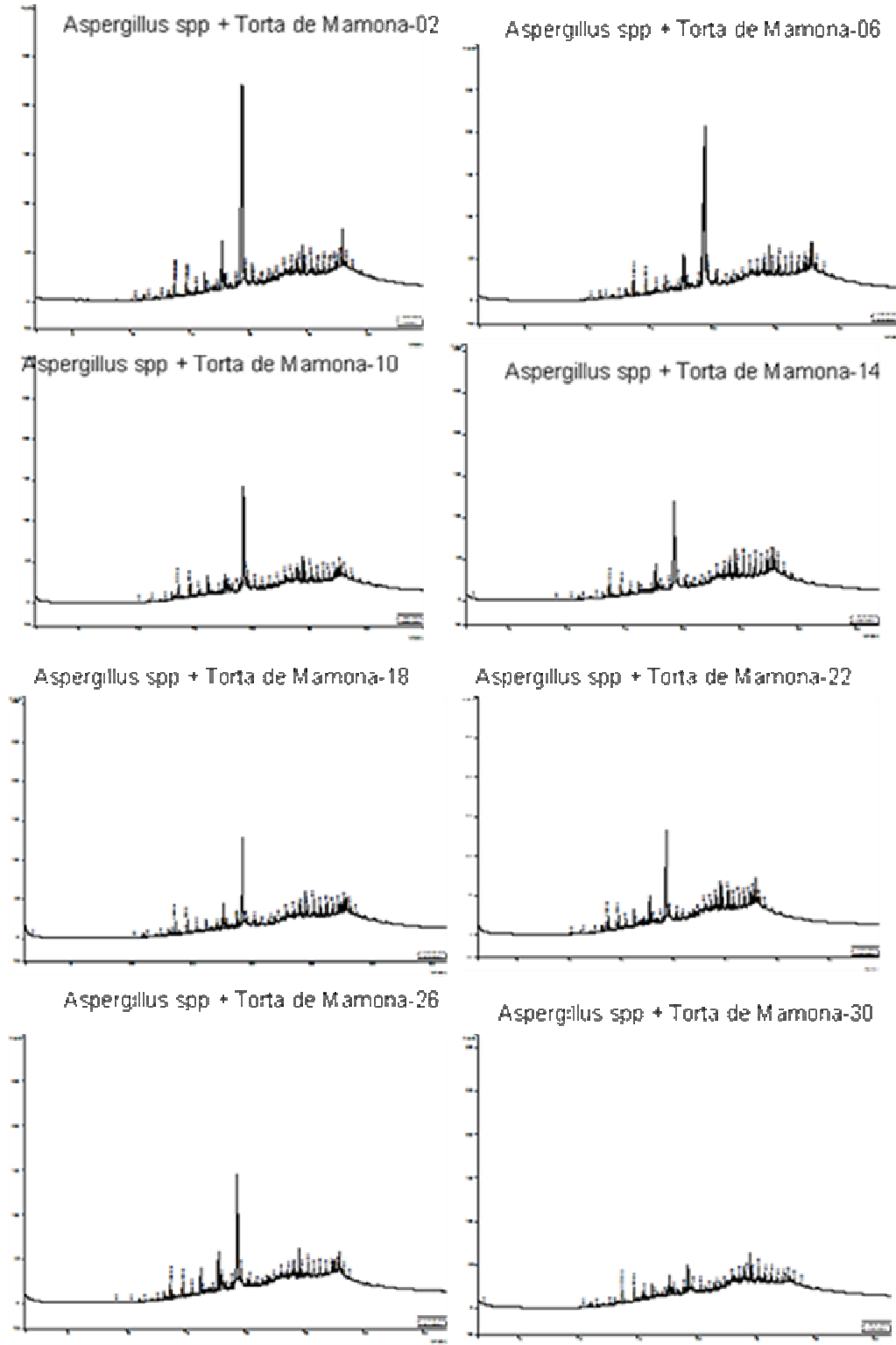
**Tabela 05:** Resultado da cromatografia de todas as simulações contaminadas

ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA DO ÓLEO TOTAL - BIORREMEDIAÇÃO MANGUEZAL - FUNGOS									
AMOSTRA NOME	$\Sigma(nC_6 - nC_{15})$ ppm	$\Sigma(nC_{16} - nC_{22})$ ppm	$\Sigma(nC_{23} - nC_{33})$ ppm	$\Sigma(nC_{34} - nC_{40})$ ppm	HTP ppm (mg HTPKg Óleo)	MCNR ppm (mg MCNR/Kg Óleo)	PRISTANO ppm (mg Pristano/Kg Óleo)	FITANO ppm (mg Fitano/Kg Óleo)	PIF
1311-01 aspg/NPK	5.02	265.97	836.89	585.14	646.4215	45806.95189	46.79	62.23	0.7518
1311-02 aspg/Mam	2.58	60.48	710.85	858.17	330.2894	34545.83681	47.32	62.86	0.7527
1311-03 penc/NPK	5.92	85.18	500.62	982.9	486.1366	25011.20674	34.79	47.47	0.7328
1311-04 penc/Mam	4.66	73.56	524.57	714.97	414.0017	39289.06355	30.86	43.6	0.70774
1311-05 aspg/NPK	4.26	74.67	565.52	1212.55	513.666	42682.78598	38.3	52.87	0.7244
1311-06 aspg/Mam	3.66	106.93	805.58	1158.25	478.6472	42308.08181	61.77	77.35	0.7985
1311-07 penc/NPK	6.12	454.31	1451.29	1471.89	546.1366	32740.84236	34.61	37.65	0.9192
1311-08 penc/Mam	7.57	100.97	602.31	916.43	534.1748	41860.16416	56.56	71.8	0.7877
1311-09 aspg/NPK	3.2	103	714.1	885.1	405.6145	25497.6215	40.1	46.5	0.8623
1311-10 aspg/Mam	2.5	83.3	913.4	1139.7	302.3738	34343.78484	55.7	75.5	0.7377
1311-11 penc/NPK	5.2	70.1	445	734.2	411.5283	30859.73282	38	51	0.745
1311-12 penc/Mam	5.4	79.7	544.3	796.9	302.5227	30649.95957	34.1	45.9	0.7429
1311-13 aspg/NPK	6.1	51.4	499.1	877.3	347.9563	29964.61094	33.88	44.9	0.7545
1311-14 aspg/Mam	6.8	67.7	889.8	1526.5	428.813	37450.12731	59.1	58.4	1.0119
1311-15 penc/NPK	6.6	106.3	455.2	886.5	289.989	34246.44293	25.7	35.3	0.728
1311-16 penc/Mam	1.7	73	844.2	1567.6	385.714	38140.73572	25.7	35.3	0.728
1311-17 aspg/NPK	2.7	70.9	491.7	596.2	284.5514	30053.3188	29.9	40.8	0.7328
1311-18 aspg/Mam	5.3	85.6	802.5	1315.4	414.9891	29432.50259	59.4	66	0.9
1311-19 penc/NPK	2.3	75	610	702.2	714.0297	53615.57324	32.3	49.8	0.6485
1311-20 penc/Mam	7.8	87.2	955.5	1806.9	601.1717	42031.34628	64.6	68.3	0.9458
1311-21 aspg/NPK	4.8	77.2	689.7	1237.6	351.9515	27623.39254	28.7	40.7	0.70515
1311-22 aspg/Mam	2.2	88.6	806.7	1305.9	512.2782	38796.53022	72	79.8	0.9022
1311-23 penc/NPK	2.3	67.2	602.7	1184.9	390.1104	32051.09204	35.1	39.9	0.8796
1311-24 penc/Mam	5.7	83.5	1049	1303.5	518.6305	31699.84502	61.5	66.1	0.9304
1311-25 aspg/NPK	2.4	50.7	634.4	819.2	468.4206	33198.18083	30.5	44.5	0.6853
1311-26 aspg/Mam	2.3	76	700.2	647.7	419.999	41962.04495	73	74.8	0.9759
1311-27 penc/NPK	7.4	457.7	2217.9	1202.6	645.5462	50310.59183	34.4	40.4	0.8452
1311-28 penc/Mam	6.5	62	710.9	868.4	363.5656	41997.00533	35	47.7	0.7337
1311-29 aspg/NPK	2.7	61.6	640.3	813.8	399.0846	33989.32811	34.1	50.1	0.6806
1311-30 aspg/Mam	6.1	83.9	752.1	674.6	335.578	43848.97607	68.3	73.29	0.933
1311-31 penc/NPK	4.2	75.5	512.5	695.4	304.6706	45023.16957	41	57.4	0.7142
1311-32 penc/Mam	4.8	121.4	1008.6	1090.6	504.939	40633.76912	7.2	69.6	0.7142

Foram selecionados os resultados obtidos da simulação de *Aspergillus* e mamona (Figura 10) e foram feitos gráficos de cada uma das semanas, acompanhando-se a biorremediação. Foi observado que nas simulações 2, 6, 10, 14, 18, 22 e 26 havia um pico acentuado entre C23 e C24 chegando a atingir 230 m Volts em tempo 20 min, provavelmente de compostos NSO já identificado no Gráfico Ternário. Entretanto na simulação 30 já não ocorre, atribuindo-se que estes (Nitrogênio, Enxofre e Oxigênio) contribuíram para as transformações bioquímicas e quebra da cadeia linear dos hidrocarbonetos. Havendo, portanto uma diminuição do pico e uma acentuada curva da base do cromatograma que indica o aumento de mistura não resolvida e aumento de biorremediação.

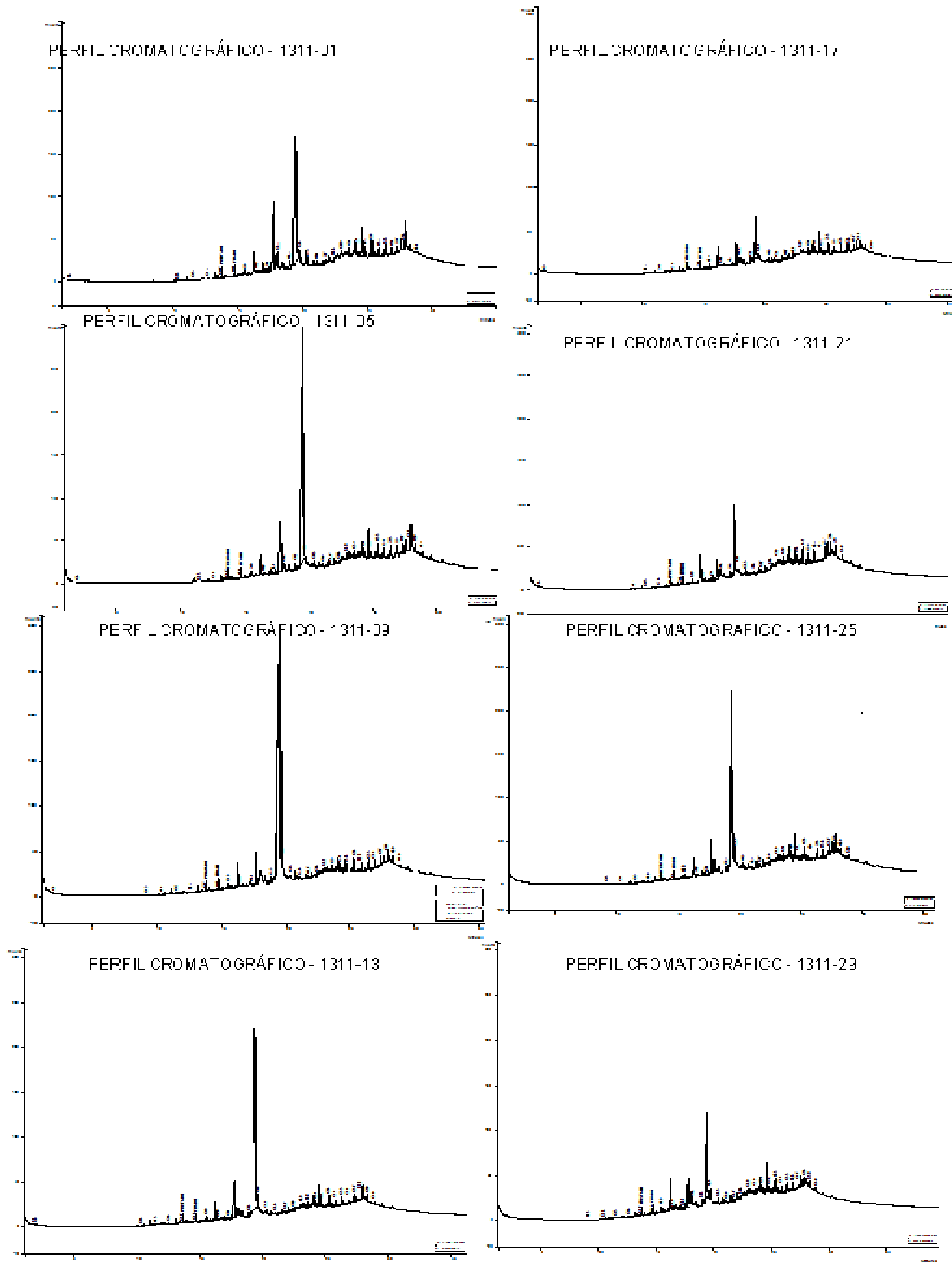
**Figura 10:** Cromatogramas óleo total – *Aspergillus* e mamona

**Cromatografia Líquida, Amostras 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30**  
**Suañalacão – Torta de Mamona + *Aspergillus* spp**



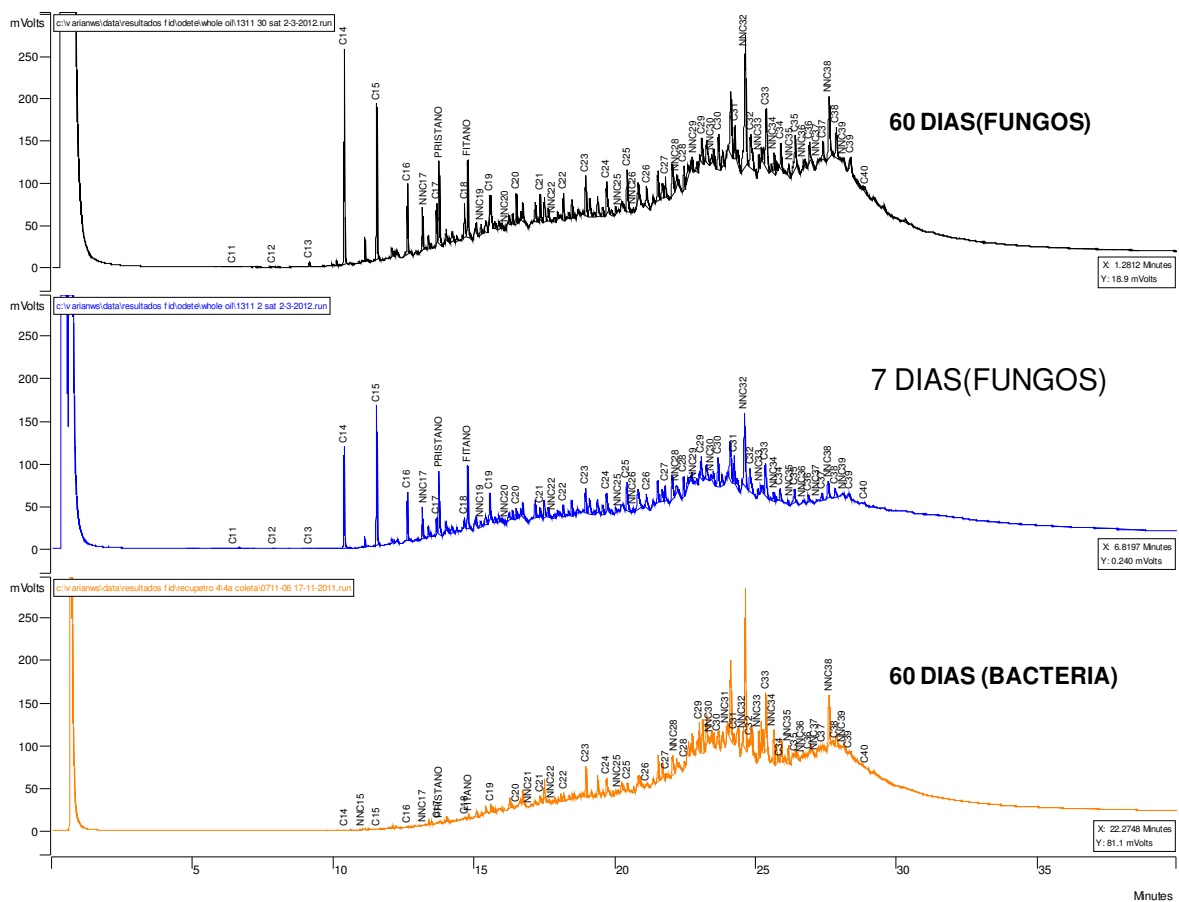
Em seguida foram feitos os gráficos das simulações de NPK e *Aspergillus* (Figura 11) o que mostra também nas últimas semanas o aumento da curva da base com mistura não resolvida e da biorremediação.

**Figura 11:** Cromatogramas do óleo total – *Aspergillus* e NPK  
Cromatografia Líquida  
Simulação 1 – NPK+ *Aspergillus* spp  
Amostras: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29



Durante o tempo em que se desenvolveu o experimental no laboratório de campo, foi também desenvolvida a biorremediação com bactéria específicas foi, portanto comparado um dos cromatogramas obtido, para discussão. Entretanto é salientado que o sedimento contaminado manguezal foi escolhido mais compactado com petróleo, enquanto que o sedimento das bactérias foi mais exsudado menos contaminado (Figura 12).

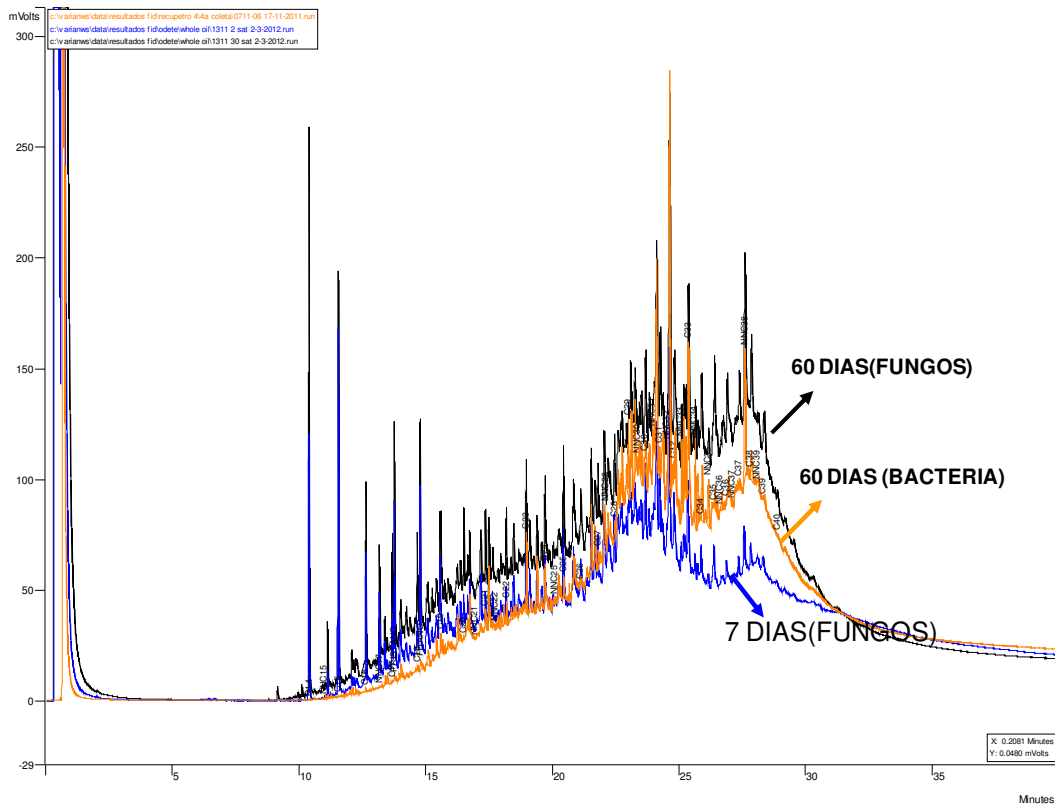
**Figura 12:** Cromatogramas óleo total – fungo *Aspergillus* 7 dias, *Aspergillus* 60 dias e bactérias 60 dias.



De acordo com o cromatograma de *Aspergillus*, 60 dias, ouve um aumento de mistura não resolvida (MCNR) e uma elevação na Figura a qual permite sugerir que ouve biorremediação, possivelmente dos hidrocarbonetos aromáticos. Isto se explica no aumento de hidrocarbonetos saturados da cadeia C14 e C15 se destacando. O que não acontece com o cromatograma de bactérias no qual é menor MCNR, entretanto é maior a biorremediação de saturado, do que se conclui que ambos contribuem para o processo de biorremediação.

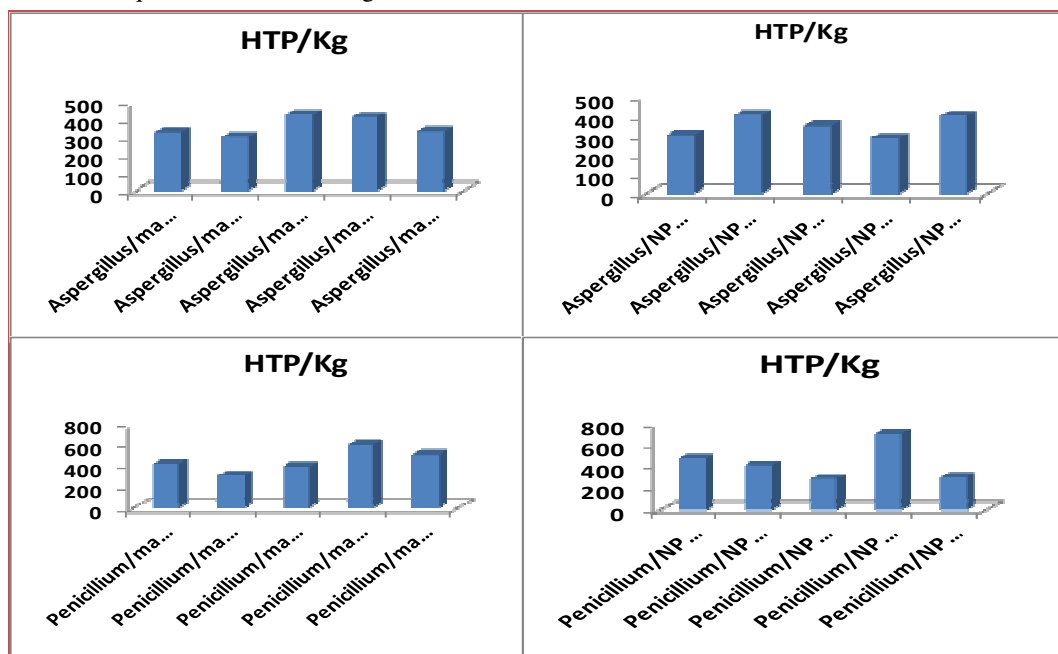
Quando sobrepostas às fotos dos cromatogramas (Figura 13) verifica-se detalhadamente o aumento da base com os compostos NSO e alcanos saturados, ocorrendo também um aumento da curva indicando a biorremediação dos aromáticos da simulação *Aspergillus* e mamona com 60 dias.

**Figura 13:** Cromatogramas óleo total – fungo *Aspergillus* 7 dias, *Aspergillus* 60 dias e bactérias 60 dias, indicando mais detalhadamente quando sobreposto.



Foram analisadas as quatro simulações e comparando-se os resultados, (Figura 14) o fungo *Aspergillus* com mamona obteve melhor biorremediação, isto é foi detectado menor quantidade de hidrocarboneto do que o *Penicillium*.

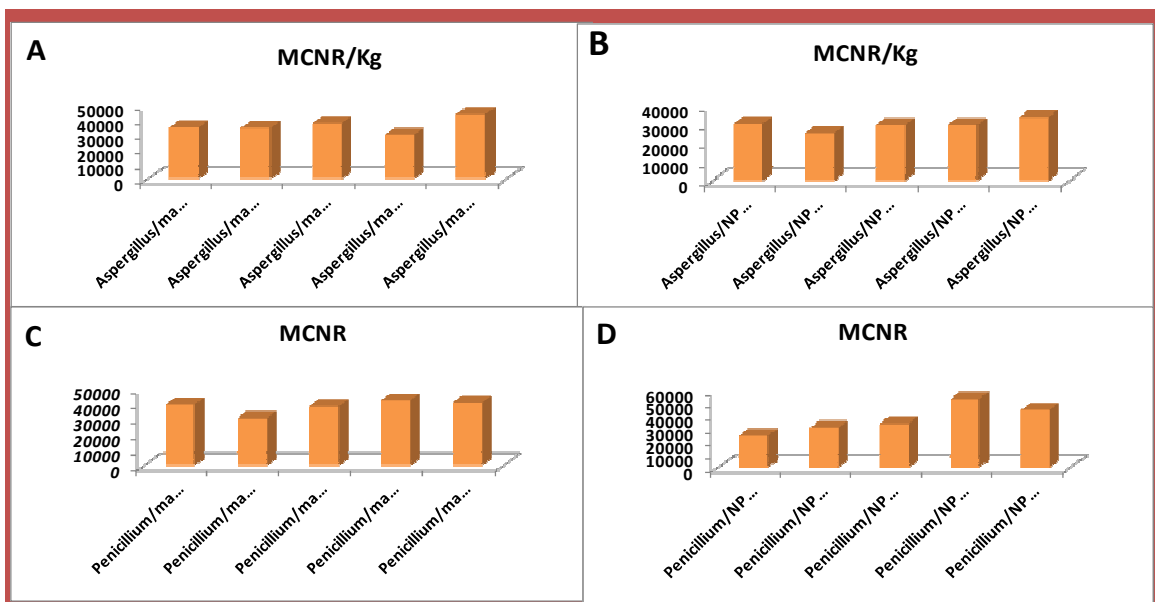
**Figura 14:** Gráfico de biorremediação dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium* com mamona e NPK, analisando a quantidade de HTP/Kg, durante 8 semanas.





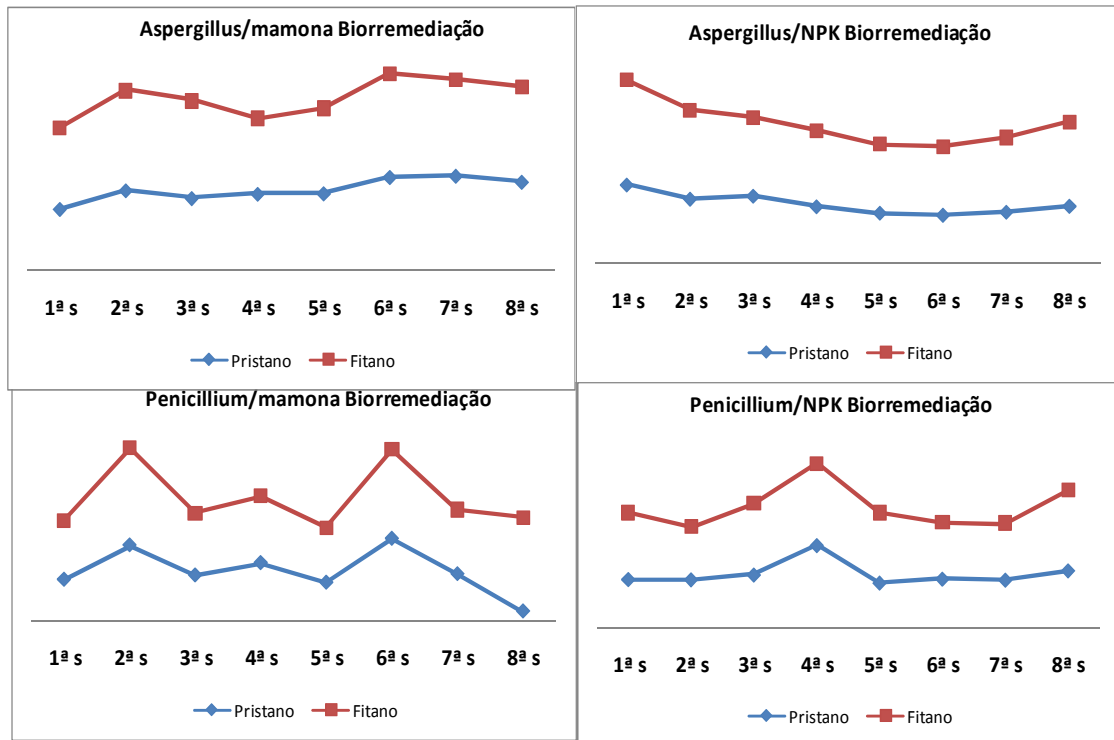
Foi calculada a concentração da mistura não resolvida MCNR, que não é reconhecida, identificada, para análise no cromatógrafo para cada uma das análises (Figura 15). Estes procedimentos foram realizados a fim de melhor analisar o aumento de hidrocarbonetos de alcanos de cadeia aberta. Verificou-se que os fungos *Aspergillus* com NPK (Figura 15 – B) obtiveram menor concentração atingindo até 40.000 ppm, o que caracteriza uma maior biorremediação seguido por *Aspergillus* e *Penicillium* com mamona em torno de 50.000 ppm (Figura 15-A e C) e *Penicillium* com NPK foi o que obteve maior MCNR em até 60.000 ppm (menor biorremediação) (Figura 15 D).

**Figura 15:** A) MCNR/Kg de *Aspergillus* com mamona; B) MCNR/Kg de *Aspergillus* com NPK; C) MCNR/Kg de *Penicillium* com mamona; D) MCNR/Kg de *Penicillium* com NPK.



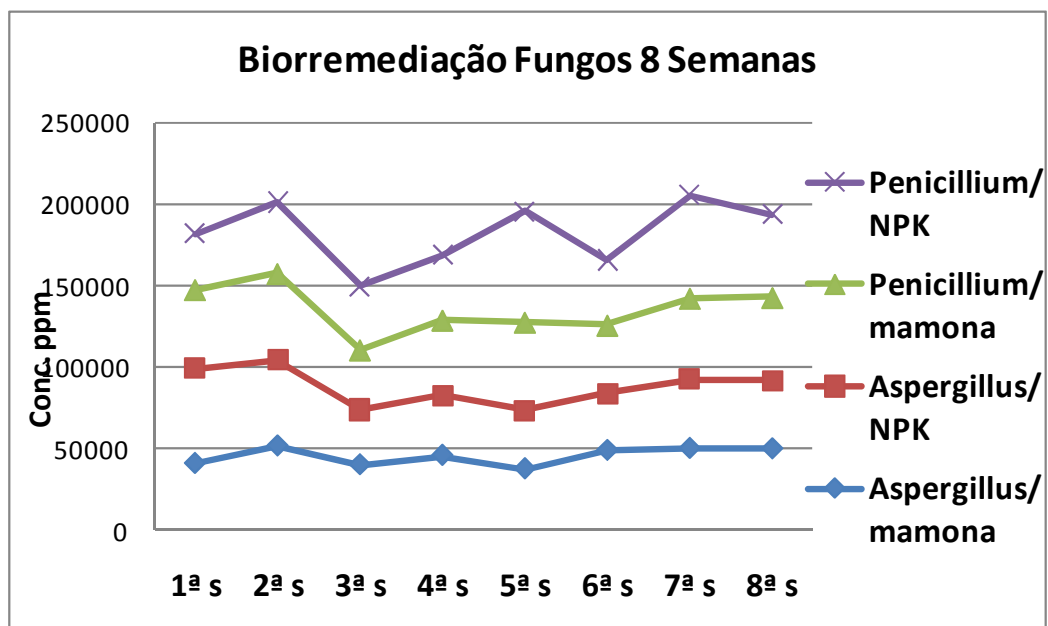
Foram feitas as alíquotas do extrato e calculado a concentração em ppm pelo tempo em semanas, o valor dos picos em ppm dos HTP do óleo ppm e do MCNP ppm (mg MCNP Kg óleo) dos marcadores Pristano ppm (mg MCNP Kg óleo) e Fitano ppm (mg MCNP Kg óleo). Desta forma foram avaliadas as degradações dos hidrocarbonetos total do sedimento manguezal, e dos cíclicos, fitano e pristano porque estes são de mais difícil degradação, servindo assim de biomarcadores (Figura 16).

**Figura 16:** Biorremediação durante 8 semanas dos hidrocarbonetos Pristano e Fitano, com Fungos.



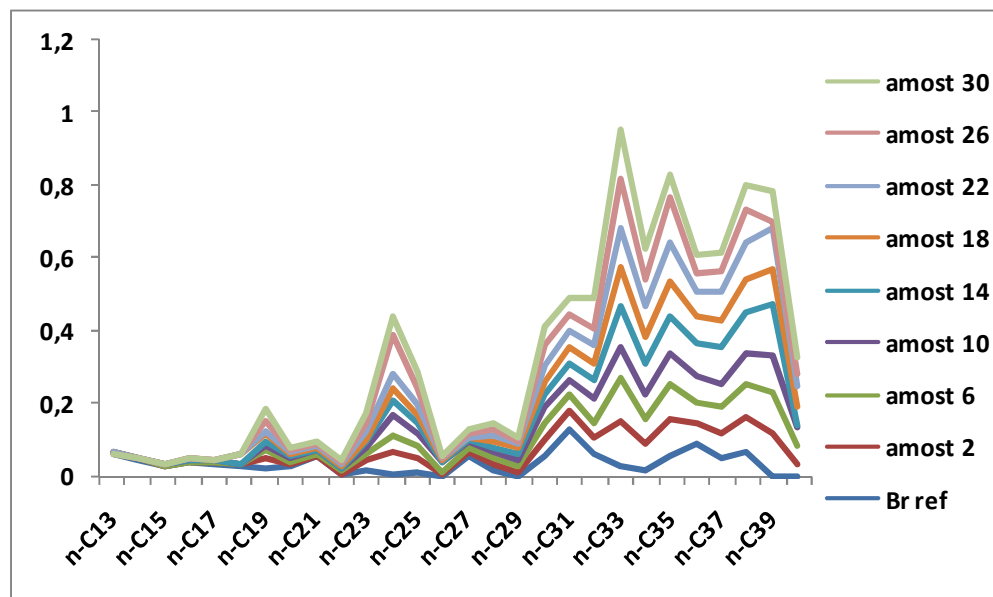
Como também ao se comparar os bioestimulantes, o *Aspergillus* com NPK mostrou-se mais eficiente do que o *Penicillium* e NPK (Figura 17). Ainda, nesta fase, no monitoramento geoquímico que visa avaliar as diversas etapas da degradação do contaminante. Foram coletadas amostras periódicas e realizado sua caracterização incluindo análise por processos cromatográficos, líquido acoplado à EM.

**Figura 17:** Biorremediação durante 8 semanas com bioestímulo mamona, NPK e bioaumentação com Fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp



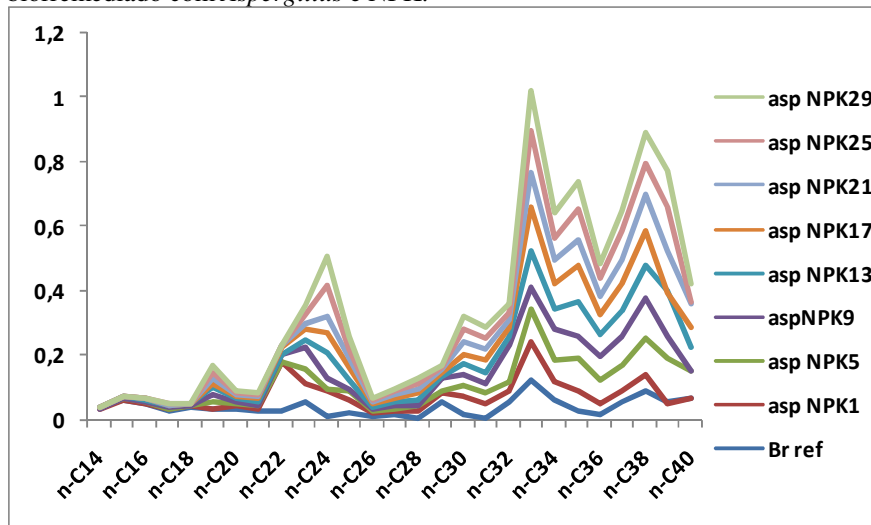
Com o objetivo de pesquisar o aumento de hidrocarboneto em fluidez na mistura microbiológica após a biorremediação foram feitas as normalizações da área total dos hidrocarbonetos totais de n-C14 à n-C40 com *Aspergillus* e mamona (Figura 18) e do *Aspergillus* e NPK.(Figura 19). Houve um aumento de hidrocarbonetos entre as cadeias menores entre C18 e C19 e entre C23 à C 25, ainda entre C33 à C38.

**Figura 18:** Normalização da área total das amostras do extrato total de sedimento biorremediado com *Aspergillus* e mamona



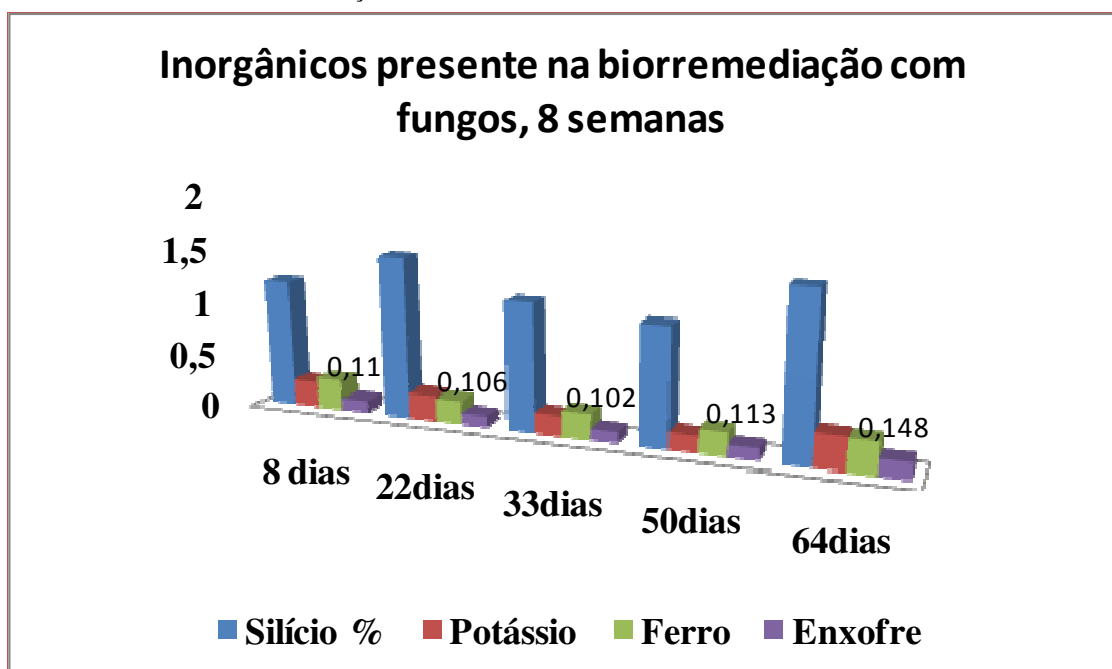
Verificou-se que nas simulações de *Aspergillus* com NPK houve um acréscimo de hidrocarbonetos maior em relação ao *Aspergillus* com mamona e em relação ao referencial branco principalmente entre C-22 e C-24, e mais predominante entre as cadeias carbônicas de C-33, 34, 35 e em C-38 e C-39 (Figura 19). Verificou-se também que, a adição de nutrientes nitrogenados, contribuiu para as transformações bioquímicas.

**Figura 19:** Normalização da área total das amostras do extrato total de sedimento biorremediado com *Aspergillus* e NPK.



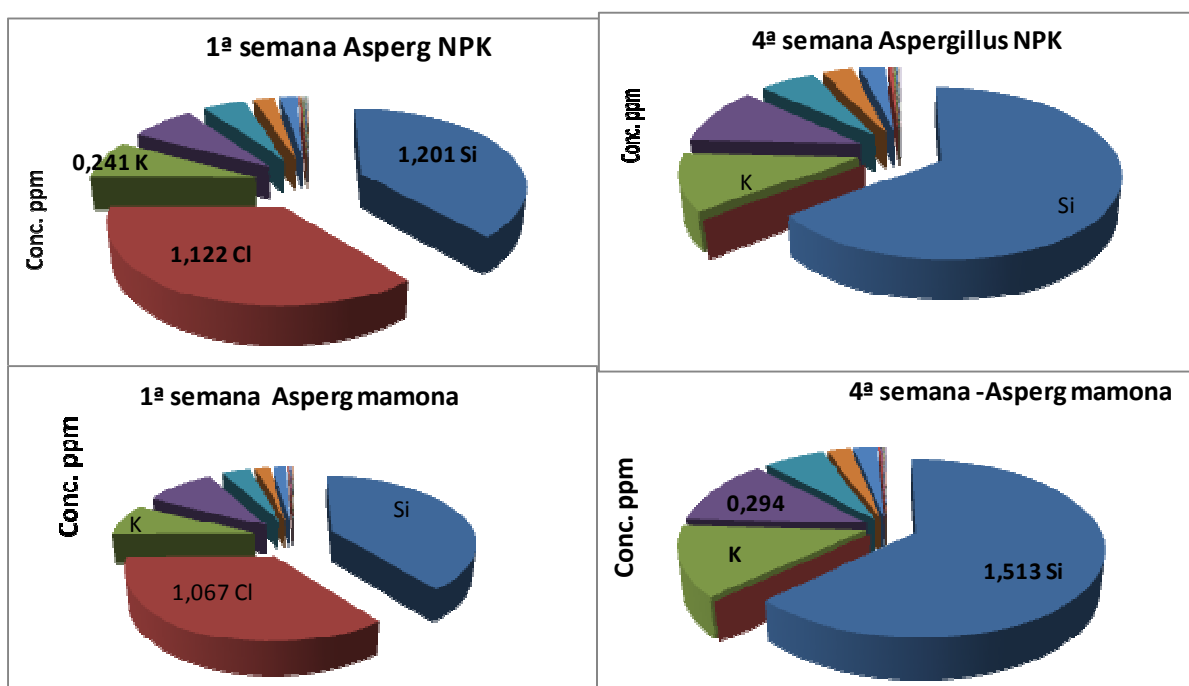
Utilizando a técnica de Fluorescência de Raios-X foi possível analisar a contribuição dos inorgânicos na biorremediação, os quais contribuem para as transformações bioquímicas dos compostos. Dentre os elementos que contribuíram para a biorremediação, o enxofre, presente no petróleo e na mamona tornou-se o principal agente nas reações bioquímicas com o aminoácido cisteína da ricina de mamona. Inicialmente foi feito a análise do sedimento manguezal. Na seqüência foram analisadas as amostras colhidas durante as 8 semanas de biorremediação.

**Figura 20:** Inorgânicos principais silício potássio, ferro e enxofre presente na biorremediação amostras de 8, 22, 33, 50, e 64 dias.



Destaca-se na 1ª semana o cloro proveniente da solução salina de produção, enquanto que na última semana do experimento aumenta o percentual de silício e o cloro (Figura 21) é carregado em reações bioquímicas em outros compostos. Desse modo, produz uma emulsão superficial de biopolímeros orgânicos na solução aquosa do tanque aquário experimental. Foi investigada a transformação bioquímica existente durante o processo de biorremediação com ricina da mamona e Fungos.

**Figura 21:** Inorgânicos presente na biorremediação com o fungo *Aspergillus* e mamona na 1ª semana e na última semana. E o *Aspergillus* com o NPK na 1ª e última semana

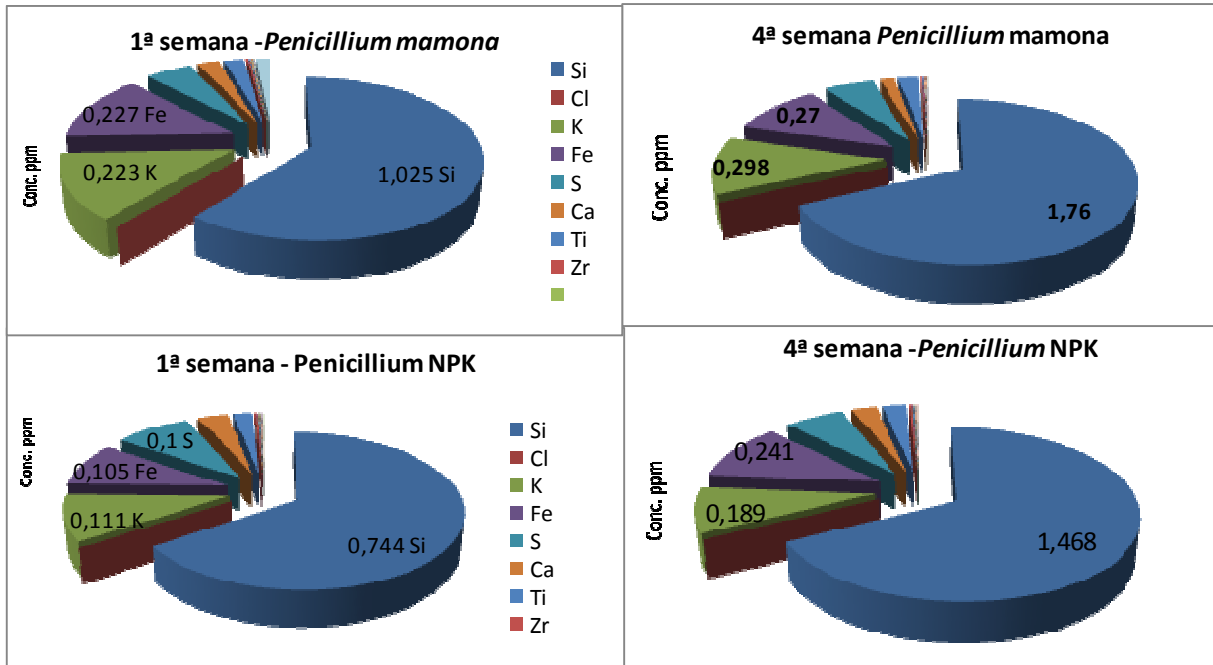


Durante a análise visual da Solução Salina, percebeu-se que, com 4 dias, a simulação com o fungo *Aspergillus* sp e o bioestímulo torta de mamona gerou, em cima da água, uma camada de emulsão oleosa, que passou a ficar escura e turva. Com 15 dias, a solução apresentava-se muito escura, com fermentação dos fungos e emulsão na superfície. Já com 34 dias, as substâncias que estavam emulsificadas formaram uma película, enquanto que a solução salina tornou-se de cor clara, sem espuma. Estas foram analisadas em XRF e Infravermelho e identificadas como Biopolímeros Protéicos. Como forma de biorremediação do sedimento contaminado, resultou pela ação dos fungos a transformação de substâncias HPAs em moléculas menores e voláteis, lançadas para a solução salina, vindo a reagir com a enzima da proteína vegetal ricina da mamona.

Foi investigada a contribuição dos metais em % durante 8 semanas da simulação de *Penicillium* com mamona e *Penicillium* com NPK. Verificou-se um aumento de metalóides na

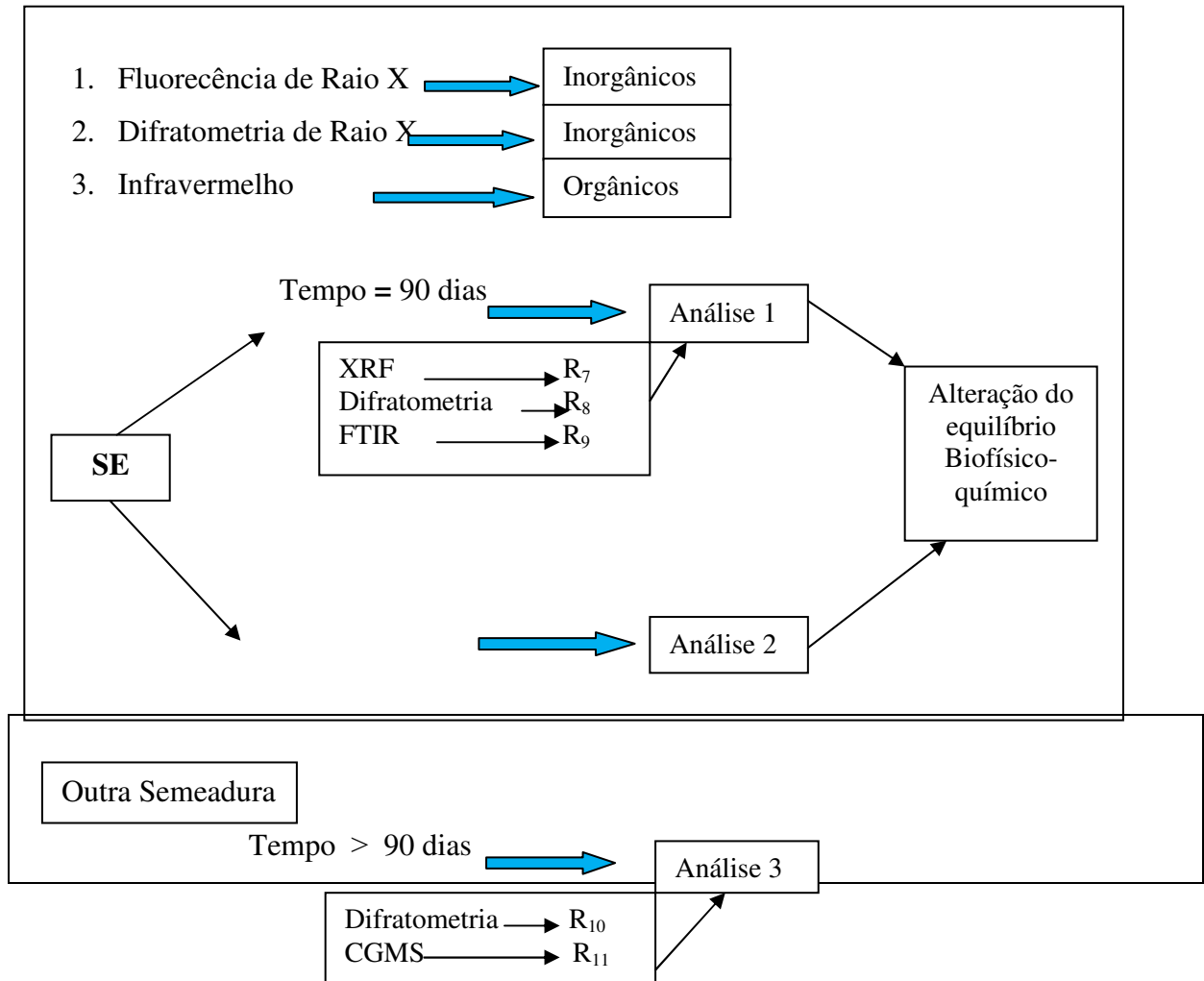
última semana de *Penicillium* com mamona em quase todos os metalóides (Figura 22). A 1ª semana de *Penicillium* com NPK foi o índice percentual de menor relevância.

**Figura 22:** Inorgânicos presente na biorremediação com o fungo *Penicillium* e mamona na 1ª semana e na última semana. E o *Penicillium* com o NPK na 1ª e última semana do experimental de simulação



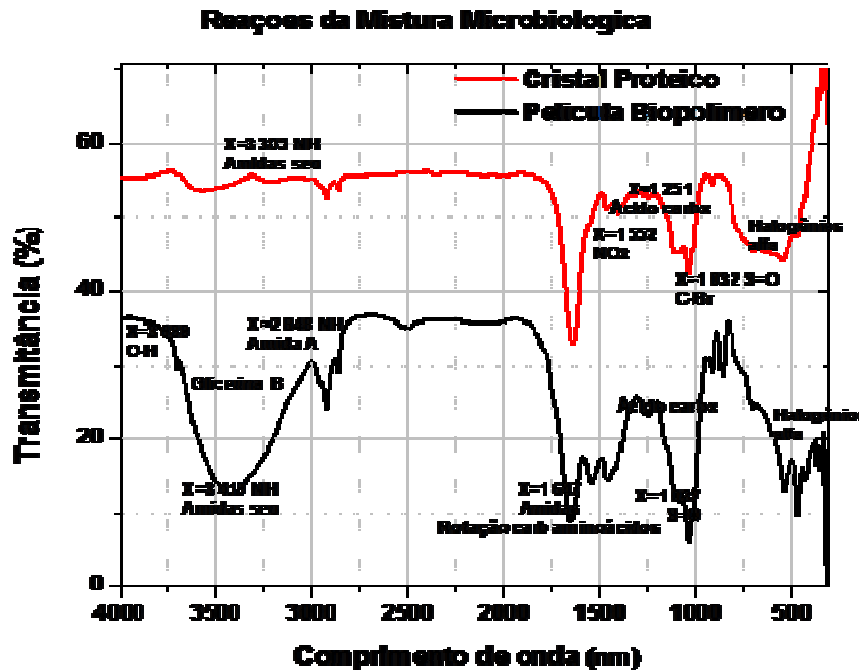
Nas sementeiras em placas de Petri não utilizadas no experimental de campo foi observado, após 90 dias da sementeira desses fungos, que haviam se desenvolvido, na parte superficial das placas, maior proliferação e concentração da população fúngica. Notaram-se acima dos esporos dos fungos, pequenos cristais sólidos, transparentes e com brilho (*Capítulo 5*). Os cristais foram produzidos a partir dos rejeitos dos fungos, isto é, filamentos dos quais se serviam como seus esporos, e provavelmente da captura dos hidrocarbonetos voláteis em sais minerais de halita. Estes foram cristalizados a partir do fator tempo, quanto mais tempo em dias, mais produziu cristalização de forma quadrada, em filetes tipo agulhas, por isso foi feita a 2ª sementeira com o fator tempo após 90 dias com cristais em filetes maiores. Com o processo de cristalização resultando no produto cristal, foi desenvolvido um diagrama esquemático (Figura 23) para a caracterização química orgânica e inorgânica, após a coleta e seleção com identificação do Cristal Proteico de Amida.

**Figura 23:** Diagrama da 2ª cristalização pelo fator tempo 1 e tempo 2



Foram comparadas as análises de infravermelho do Biopolímero e Cristal Protéio, como resultado, foi constatado os picos nitrogenados e halogenados atuando em reações de transformações de diferentes tempos, locais, estado físico e, finalmente, na produção de produtos. Podem-se verificar os mesmos compostos orgânicos dos grupos funcionais que se obteve com a análise de infravermelho do produto residual cristalizado. Porém, a transmitância da película membranar se efetiva de 0 a 40%, enquanto que a transmitância, fração de energia luminosa, incidente do comprimento de onda do cristal se efetiva acima de 30 a 60 %. Observou-se em ambos os espectros o pico  $X= 1.637$  de amidas secundárias.

Figura 24- Comparação entre os infravermelhos do cristal proteico de amida e do biopolímero, evidenciando a presença da Amida no primeiro.



Após a obtenção dos resultados foi feito estatisticamente a Análise Covariante dos Dados - PCA e se analisou a maior e menor biorremediação das amostras de *Aspergillus* e mamona e *Aspergillus* e NPK (Figura 25). Sendo que para *Aspergillus* e mamona obteve-se no fator (2) 23,19%, com maior concentração dos HTP na amostra 14 e menor concentração na amostra 18 (4ª semana). Para o fungo *Aspergillus* e NPK obteve-se no fator (2) 21,72 %, com maior concentração na amostra 13.

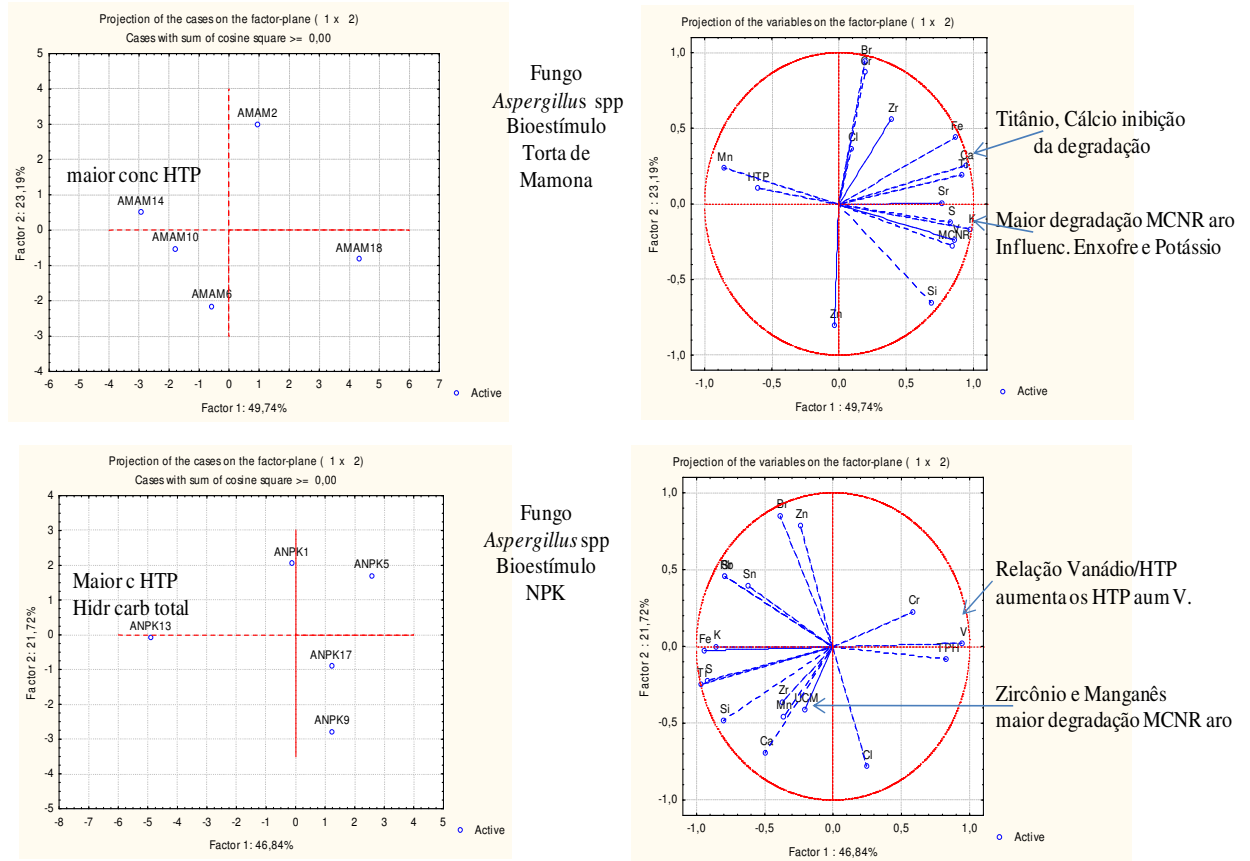
Foi comparado em gráficos estatísticos os resultados de cromatografia com relação aos inorgânicos de XRF e observou-se que com *Aspergillus* e torta de mamona há uma maior degradação de MCNR (aromáticos) com a influencia de Enxofre e Potássio. No entanto há uma inibição da degradação com Titânio e Cálcio.

Com o fungo *Aspergillus* e o bioestímulo NPK ouve uma maior degradação de MCNR (aromáticos) com Zircônio e Manganês e menor degradação com Vanádio.



**Figura 25:** Comparação estatística dos dados de Cromatografia e XRF de amostras de *Aspergillus* spp com torta de mamona e *Aspergillus* spp e NPK.

### Biorremediação – Cromatografia *Aspergillus*/Torta Mamona e NPK Com Relação aos Inorgânicos XRF



No capítulo 4, tem-se o artigo 1 que trata da mistura microbiológica a qual foi aplicada na biorremediação de campo desse trabalho. Explica como foi concebida e comprova a sua eficiência através das técnicas de XRF e cromatografia gasosa. Esse artigo será publicado na revista *Marine Pollution Bulletin*, de acordo com suas normas.

No capítulo 5, tem-se o artigo 2, que trata do procedimento e validação da biorremediação propriamente dita, com a identificação do sub-produto biopolímero. Discute os dados de validação através das técnicas de XRF, cromatografia gasosa e infravermelho. Esse artigo será publicado na revista *Marine Pollution Bulletin*, de acordo com suas normas.

No capítulo 6, tem-se o artigo 3 que trata do produto específico Cristal Protéico de Amida. Discute a caracterização da composição química do cristal através das técnicas de XRF, cromatografia gasosa, infravermelho e difratometria de Raios-X. Esse artigo será publicado posteriormente em revista específica ainda não definida.

Nos Apêndices estão expressos outros resultados obtidos com a pesquisa desenvolvida bem como solicitações de depósitos de Patentes de Invenção (PI).

Destaca-se que as patentes solicitadas são:

1 – (Apêndice H) Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Instituto de Geociências. Cristina Maria Quintella; Odete Gonçalves; Patente de Invenção BR 221109478318 - **PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTÉICO**, 2011.

2 – (Apêndice I) Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Instituto de Geociências. Cristina Maria Quintella; Odete Gonçalves; Jorge Alberto Trigiüis; Patente BR 221109478199 - **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSSENSORES E BIOSSENSORES**, 2011.

3 – (Apêndice J) Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Instituto de Geociências. Cristina Maria Quintella; Odete Gonçalves; Patente de Invenção BR **ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO, (em sigilo)**, 2012.

Além disso, nos Anexos encontram-se resumos e artigos apresentados em congresso, anexo da Figuras da proteína ricina e dos aminoácidos cisteína, e fotos do experimental de campo durante o desenvolvimento dos trabalhos.

## 4. Process and obtain biodegradable product for bioremediation of oil-impacted areas with a consortium of microorganisms' co-products of a first generation of biodiesel

Authors: Odete Gonçalves; Cristina M. Quintella

Laboratório de Cinética e Dinâmica Moleculares, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia; Campus de Ondina, Salvador, BA, Brasil, CEP: 40.170-290, FAX: 55-71-2355166.

### Abstract:

The present invention relates to a process of obtaining a biodegradable product for use in bioremediation processes of soil, water and substances and areas impacted by the presence of non-native chemical or chemicals in concentrations that are different from what the environment usually produces. The product of this article described herein is intended to bioremediation processes in areas impacted by oil spills, oils, greases, fats, waste, fuel, naphthalene, polycyclic aromatic hydrocarbons. It was developed a microbial mix with the fungus *Aspergillus fumigatus* in a consortium with crude glycerin and castor bean from the biofuel, biodiesel from castor beans. After measured the concentrations of each product, the samples were taken to the heater magnetic stirrer for 3 min and reserved. The fungi were added into the mix and then closed. The aliquots analyzed on days zero, 24, 32, 90, 257 and 437 days by gas chromatography to monitor the presence of paraffins and by spectrofluorimetry to monitor the total degradation of oil in existing fluorophores.

Keywords: Process, Oil, Fungi, Castor Oil, Bioremediation

### 4.1 INTRODUCTION

Common problems are caused by the oil due to leaks, spills and environmental accidents involving fossil fuels and their derivatives. The need for remediation of these scenarios has recently become mandatory. Moreover, environmental agencies apply penalties to confirm the degree of private corporate responsibility.

From this perspective, bioremediation is a form of remediation caused by microorganisms, which have the ability to metabolize compounds contaminants and transform them into inert CO<sub>2</sub> and water. Another alternative form of remediation is the Phytoremediation that involves the use of plants, microbes associated with their soothing and soil, and appropriate agronomic practices. Usually used on bacteria, its use has the advantage of being less aggressive to the environment. Overall, the use of indigenous fungi is still little explored.

Remediation may also be generated by enzymes that convert the fission core intermediate compounds that can be used in common pathways to generate energy and carbon by bacteria. It is also known that the surfactant proteins can interact with the glycosylated antigens of *Aspergillus fumigatus*.

In this sense, the objective of this work is to demonstrate how the consortium of microorganisms co-products of a second generation of biofuels that allow the enzymatic process of the microbial mixture. This mixture was composed of waste oil, sand, ash, produced water, crude glycerin and castor bean. The pathways chosen activate and accelerate growth of hydrocarbon metabolism. Moreover, the objective is to point out the possibilities of applying the product of microbiological process in the remediation of areas impacted by petroleum, oils, greases, oils and waste fats, fuels, hydrocarbons, polycyclic aromatic naphthalenes, among others.

Bioremediation is a technique scientifically proven and environmentally friendly which proposes the use of plants and microorganisms in the treatment of toxic wastes potentially reducing their hazardous potential (ATLAS, 1995 ab). Moreover, this process is responsible for the decontamination of environments impacted by oil and other oils.

The maximum benefit of this mineralization process is getting as end products CO<sub>2</sub> and water through aerobic and biomass formation (CUNHA, 1996). This is produced by the action of microorganisms such as bacteria and fungi, which may be limited availability of nutrients, composition and abundance of dissolved oxygen distribution and nature of the spilled oil (ROSA, 2001).

The transformation of hydrocarbons by microorganisms (fungi) can be facilitated through the production of enzymes as biological catalysts, ie enzymes produced by microorganisms control the biochemical reactions producing energy and material needed in the proliferation of new microbial cells (UNA, GARCIA, 1983). They also produce extracellular oxidative enzymes capable of breaking polycyclic aromatic compounds and long chain transforms them into compounds assimilable to its metabolism. This transformation of redox and may be enhanced by transition metals present in the sandstone sediments, forming the organometallic protein, simple organic molecules (metallo-enzymes) produced by fungi, enzymes, proteases. Consequently, these enzymes hydrolyze peptide bonds, releasing peptides that are degraded to free amino acids by peptidases (RODWELL, 2009). Studies indicate increased bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), increased rate of solubilization of heavy metals, naphthalenes by the use of biosurfactants (PASTORE NITSCHKE, 2002).

In the case of mixed microbial presented here, the effective bioremediation initially with the consumption of vegetable protein (ricin) from castor bean by fungi and then with increasing fungal population, which consumes the hydrocarbon oil. In this sense, the plant

protein ricin, which is used as an energy source for the fungus, may modify its enzymatic activity favoring the mineralization of organic compounds existing in the oil.

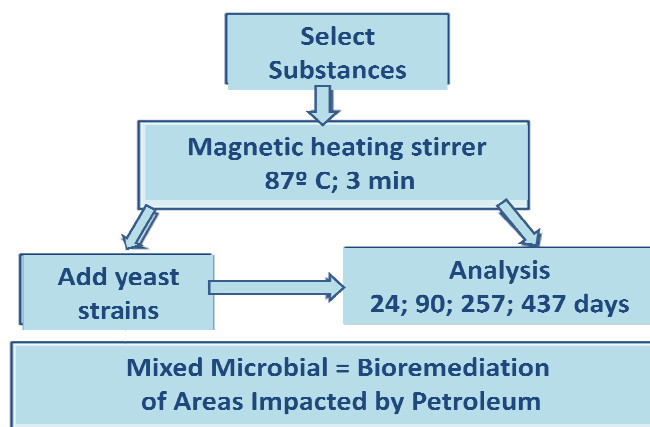
In the final step in the biodegradation process, when nutrients are scarce, the fungal colony starts to process the materials available in the middle, such as hydrocarbons. After this time, the crude glycerin co-product of biodiesel production that contains a mixture of glycerin, acids, esters, alkalis and alcohols, oils, glycerol, water and various salts alters the interfacial tension, viscosity and allows the act that the fungus acts more intensely on the ricin. The castor bean containing a metallo-protease inhibitor, a cysteine amino acid protein ricin, which uses a metal ion in their catalytic mechanism into the process of hydrolysis of proteins. Thus, one can observe that the castor oil containing a high protein content, which makes a good raw material for the production of amino acids.

## 4. 2 Materials and Methods

During the simulation run of the tertiary recovery of oil paraffinic, samples are taken and stored in 50 or 50 min with 25 ml contents of each bottle. The growth of fungi in vials containing oil and aqueous solution was observed at room temperature. Removing a small amount of fungal colony has been duly weighed and identified to be analyzed. The process was repeated three more times after the identification and isolation of the fungus for its verification with the same means as previous experiments.

Laboratory Identification: The fungus isolated in this study by means of isolation techniques and presented a fast-growing colony, initially white, becoming dark green with reverse colorless, granular appearance and the fringed edges and circular outline, but limited. The micromorphology showed the presence of vegetative hyphae, branched, septate, colorless, small conidiophores with terminal vesicles globosas and conical, with a single row of phialides, the upper two-thirds of the gallbladder, and conidial production round and green. These morphological characteristics led to the identification of the fungus *Aspergillus fumigatus*.

The procedures for implementation of microbial mixture (Figure 01) follows his preparation as instructed and specifications, as the quantification and the steps to follow in the diagram.

**Figure 01:** Scheme of microbiological mixture

The biodegradable product, from the process, is composed of residual oil (13.25%), sand, ash (38.46%), water production (32.05%), crude glycerin (12.82%) and pie castor (3.37%). This mixture was heated to 70 ° C and 97 ° C where it remained constant agitation for 3 min.

The procedures for obtaining the mixture Microbiological, biodegradable product are as follows:

- 1) Weigh and / or measure each of the systems listed above and prepare the mixture in their pre-established standards;
- 2) Bring the heater magnetic stirrer in 200 mL beaker with temperature to 85 ° C for 3 min;
- 3) Remove the mixture from the shaker and at rest, add specific strains of the fungus has been identified;
- 4) Seal and identify in Petri dishes;
- 5) Monitor the incubation and development of fungi with periodic reviews.

Then the mixture was closed, and aliquots analyzed on days zero, 24, 32, 90, 257 and 437 days by gas chromatography to monitor the presence of paraffins and spectrofluorimetry to monitor the total degradation of oil in existing fluorophores.

To check the concentration of hydrocarbons was used Gas Chromatograph (GC) Factor Four Varian 3900, with VF-5ms capillary column 30m x 0.5mm, 025um. We used also a spectrofluorimeter Perkin-Elmer LS55 equipped with a 150 W xenon lamp and quartz cells of 1 cm. The fluorescent emission spectra of the samples were obtained by detecting the emission from 300 to 900 nm at 0.5 nm, while the sample suffered excitement in fixed wavelengths in the range from 250 to 700 nm with an increment of 50 nm, making a total of 10 wavelengths of excitation. The readings were taken with a slit of 2.5 nm and scan speed 1200 nm / min.

We used the software Origin ® Pro 8 for the mapping of molecular fluorescence. For the process of creating the microbial mixture can be better understood its detailed description is given below.

The fungus *Aspergillus fumigatus* can be present in various media, is facultatively anaerobic, meaning it can operate with or without the presence of oxygen gas, and withstands a wide temperature range. The process of obtaining the product under this Article shall include: an aqueous solution of salt to add castor bean, in a proportion that ranges between 1.5% p / p 9% w / w, crude glycerin, which in example, may be from the production of biodiesel, in a proportion that ranges between 2% p / p 30% p / p, and then add at least one strain of *Aspergillus fumigatus*.

The proportion of castor oil, which naturally contains ricin, is preferably in the range of 2% p / p 5% p / p, the proportion of crude glycerin is preferably in the range of 5% w / w 20% w / p, more specifically, in the range of 10% p / p 15% p / p. The product thus obtained is then incorporated into the contaminated medium and which is intended to remedy.

The method employed in bioremediation, this follows an operating mechanism comprising the following steps:

- An initial stage of the biological action in the fungal bioprocesses generating amino acid cysteine in general, and oxygen, and bioprocesses to generate chemical energy and increase the efficiency of the process, leaving a homogenous material in the process of transformation;

- An intermediate step in which growth occurs where the colony of these fungi produce proteases that interact with the ricin contained in the castor bean pie, with cysteine produced in the initial stage, which releases transition metals, allowing the spread of the fungal population. The presence of salts, this step allows the medium becomes acidic, also favoring the increase of the population of the colony, whereas the presence of impurities in crude glycerin allows the fungus acts more intensely on the ricin, and therefore occurs a fermentation that releases carbon dioxide gas, which makes the most porous and allows volatile contaminants are released.

- The final stage refers to when the nutrients provided initially to the fungal colony for the product object of this article become scarce and it starts to process the materials available in the middle, which are contaminants, allowing it to bioremediation of medium, releasing water and carbon dioxide.

To make this process successful, it was necessary to advance analysis of the mixture as the sand scorched, sandy soil to simulate. After reviewing her x-ray fluorescence, found

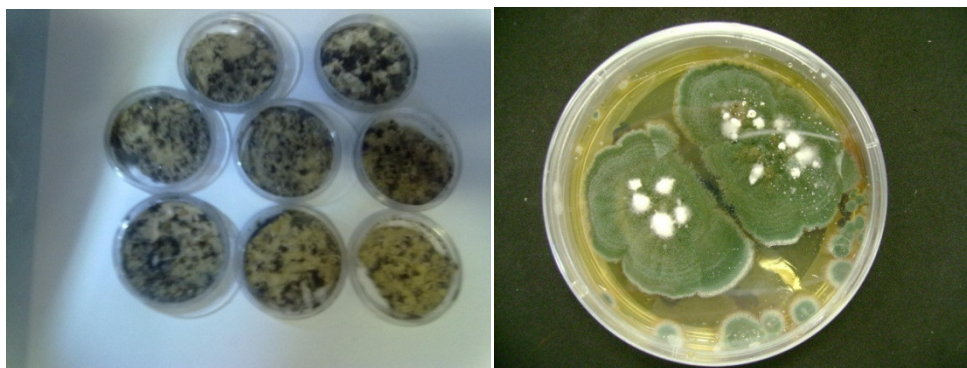
that 16 contained metal components and transition metals: cadmium (0.37%), copper (0.03%), tungsten (0.10%), vanadium (0.04%) and cobalt (0.01%) (table 1).

**TABLE 1:** X-Ray Fluorescence 4 sand samples calcined.

Substance	Sand 1	Sand 2	Sand 3	Sand 4	Total	%
Si	55.01	84.71	44.10	55.19	239.01	59.99
O	37.33	-	38.17	44.22	119.72	30.05
Ca	3.74	9.67	15.12	-	28.53	7.16
Cd	1.38	-	-	-	1.38	0.35
Fe	0.99	2.64	0.88	0.29	4.80	1.20
Ti	0.29	0.99	0.24	0.05	1.58	0.40
W	0.12	0.30	-	-	0.42	0.10
Cr	0.05	0.14	0.07	0.05	0.31	0.08
P	0.05	-	-	-	0.05	0.01
V	0.04	-	-	-	0.04	0.01
S	0.04	-	-	-	0.04	0.01
Zr	0.04	0.09	0.09	-	0.23	0.06
Al	-	0.70	0.25	0.12	1.07	0.27
K	-	0.31	0.17	0.07	0.54	0.14
Sr	-	0.06	0.07	-	0.13	0.03
Co	-	0.05	-	-	0.05	0.01
<b>Total</b>	<b>99.07</b>	<b>99.66</b>	<b>99.18</b>	<b>100.00</b>	<b>397.91</b>	<b>99.87</b>

The method of operation of the product was thus fulfilled in its stages: initial, intermediate and final bioremediation. To this was made the selection and quantification of the products, and the fungus *Aspergillus fumigatus* added to a proliferation sowing system (Figure 02).

**Figure 02:** Seeding of the fungus *Aspergillus fumigatus*



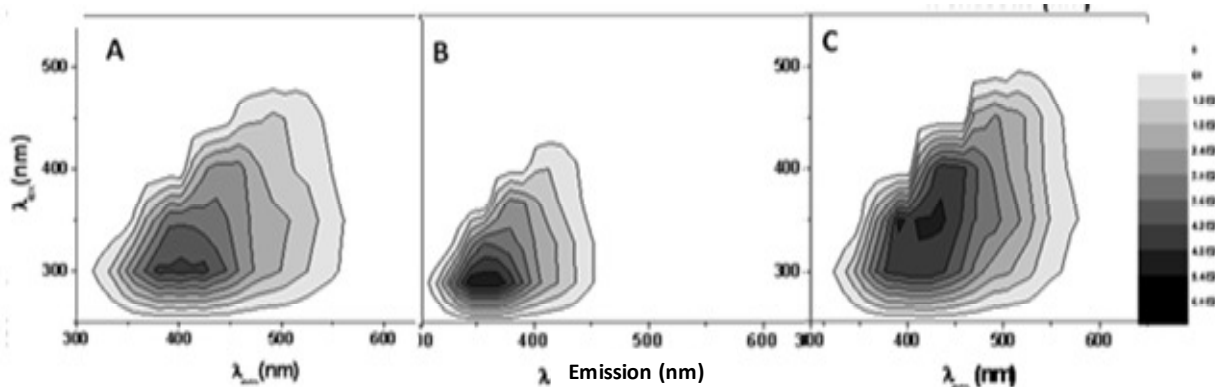
The research project began when he found that in samples taken from the experimental reservoir in enhanced oil recovery paraffin had developed micro-organisms. After analysis, was isolated and identified the Fungi Kingdom, Phylum Ascomycota, the Genera *Aspergillus* the fungus *Aspergillus fumigatus*. The microbiological analysis of fungi were performed in the Laboratory of Microbiology and Food Science, Faculty of Pharmacy, Dept. Clinical Analysis and Toxicological FFAR / UFBA, through the techniques of micro potato cultivation in agar, described by Lacaz (2002), with seeding of the strains in Petri dishes containing Sabouraud Agar added of chloramphenicol and incubated at 28 ° C for five days.



Further analysis showed that visually 7 days, the population of the fungus had generated several outbreaks, having proliferated intensely. Samples were taken at 0, 24, 32, 90, 257 and 437 days. The characterization of paraffins by gas chromatography showed the samples from time zero and blank (no fungi) the existence of six peaks attributed to anthracene, phenanthrene, pyrene, C22, chrysene, C28. By the time 32 days, gas chromatography showed the absence of peaks corresponding to anthracene, phenanthrene, pyrene. There was also an increase in relative concentration of three peaks corresponding to C22, C28, and chrysene, due to the reduction of the concentration of others. Thus, it was possible to identify the effect of bioremediation refers to hydrocarbons.

The characterizations by spectrofluorimetry, used to monitor the fluorescence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were obtained at 0, 24, 90, 257 and 437 days. It was observed that there was a maximum excitation at 300nm and emission between 370nm and 430nm at zero and 24 days (Figure 3).

**Figure 03:** A, B, C, maps of fungal molecular fluorimetry 0, 24 and 90 days.



However, in the sample of 90 days, not only this maximum migrated as distributed in a broad region between 340 nm with excitation and emission between 390nm and 460nm (Figure 3 C). This change was explained by the increased relative concentration of PAHs due to consumption of linear hydrocarbons, the latter also confirmed by gas chromatography. In the days to 90 days later, fluorescence was reduced dramatically, indicating that the PAHs were consumed. Thus, it was possible to prove that the use of the product, within 32 days is given to linear hydrocarbons for bioremediation and that within 90 days is given for PAHs bioremediation.

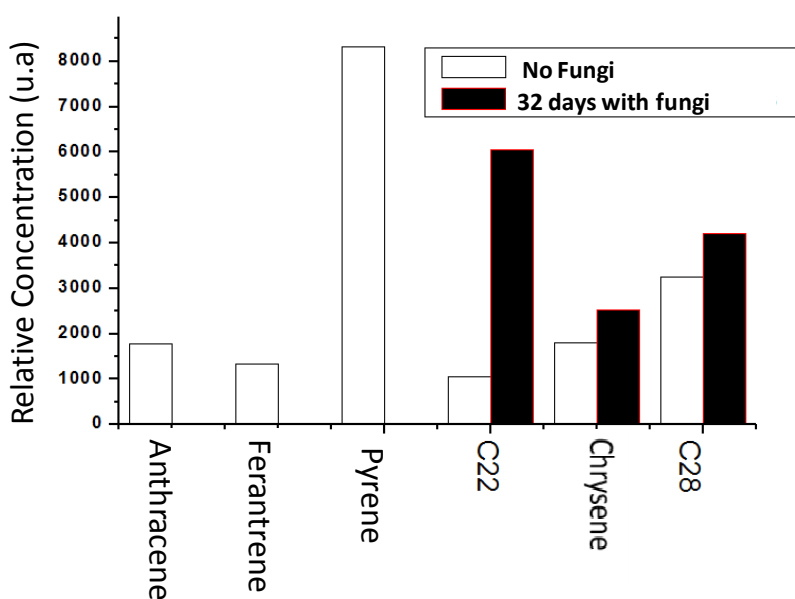
#### 4. 3 RESULTS

The data interpretation of gas chromatography showed the existence of six peaks attributed to anthracene, phenanthrene, pyrene, C22, chrysene, C28 for the sample analyzed at time zero before adding yeast.

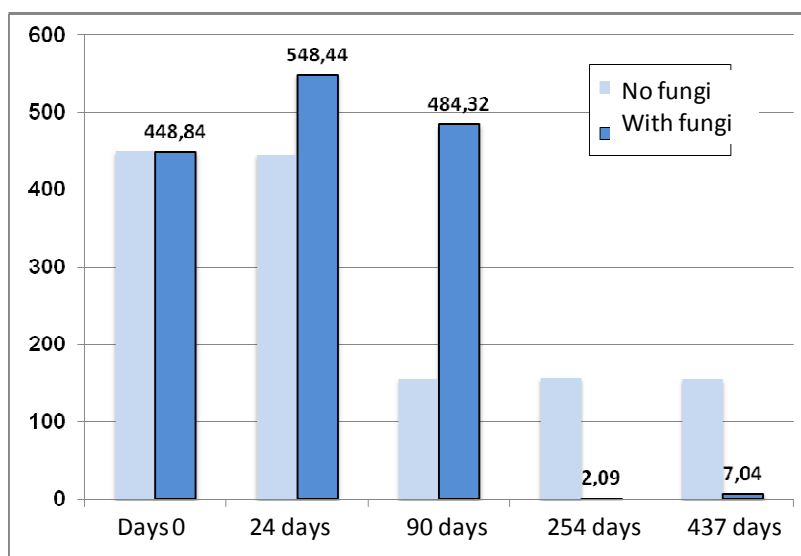
In the sample analyzed after 32 days, we observed the absence of peaks corresponding to anthracene, phenanthrene and pyrene and the increased concentration on C22, C28, and chrysene.

By comparing the results one can conclude that there was total breakdown by fungi of polycyclic aromatic hydrocarbons, anthracene, phenanthrene and pyrene, with formation of aliphatic paraffins, which shows the effect of bioremediation. Only in the case of chrysene (figure 04), an increase of its concentration after 32 days.

**Figure 04.** Graph of the relative concentrations of hydrocarbons in the microbial mixture at time zero and after 32 days.



The interpretation of the results of spectrofluorimetric analysis of samples from 0 to 437 days (Figure 05) showed that after 90 days dramatically reduced the fluorescence, which can be explained by the biodegradation of hydrocarbons policíclicos aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungi.

**Figure 05:** Graph of fluorescence intensity versus time in days

From these data achieved considers the possibility of further research with microorganisms and nutrients as co-products of biodiesel from castor for environmental bioremediation of areas impacted by oil.

## FINAL COMMENTS

The association of *Aspergillus fumigatus* to the co-products of biodiesel made possible the biodegradation of polycyclic aromatic oil. It was possible due to the action of phenols and naphthalenes that accelerates the biodegradation process.

The castor bean has the amino acid cystine is a carboxypeptidase, cysteine protease or metallo-protease, it uses a metal ion in its catalytic mechanism and hydrolyze proteins into amino acids that facilitates their uptake by cells and has a depolymerize role.

Important to note that polycyclic aromatic hydrocarbons degradation are difficult and harmful to health of living beings, which leads us to believe in the importance of the work to create this mix microbiological.

The process described in this paper can be applied in bioremediation processes of mangroves and areas impacted by spills of oil and derivatives, but also in any area where the spill occurred in other oils. After this application, we can see that the soil after the bioremediation process is able to accept life arising flora and fauna, thus contributing to improving the lives of people living around polluted and degraded areas due to accidents non-renewable energy products.

The biological components of the mixture are biodegradable natural substances, found in nature and returning it in a non-aggressive, but processed by decomposing agents and the

fungus *Aspergillus fumigatus* found in the oil and proliferated in culture anaerobic optional. This makes the process a clean technique with social responsibility and the environment reaching the goals of being an international reference contributing to sustainable development. The fact that it used the technique of optional anaerobic fermentation of the fungus favors voluntary performance in the ducts and in the most extreme places without oxygen or in clay sediments mangroves.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This is a good opportunity to thank the Laboratory XRF / UFBA by analysis of sand calcined, the Laboratory Toxicological Analysis IBIO / UFBA by isolation and identification of the fungus, the Institute Polytechnic UFBA for glycerine and castor bean and Maxidril Equipment E & P to grant waste oil.

## REFERENCES

- ATLAS, R.M., Bioremediation. **Chemical & Engineering News**, v. 3, p. 32-42, 1995a.
- ATLAS, R.M., Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 178-1821, 1995b.
- BELTRÃO, N.E.M., Torta de Mamona (*Ricinus communis* L.): Fertilizante e Alimento. **Comunicado técnico n. 171 da Embrapa**, 2003. ISSN 0102-0099.
- BEYNOM, R.J., BOND, J.S., **Proteolytic enzymes: A practical approach**. Academic press. Oxford. (eds).1989. Lemos, J. L.S.; Araújo, F.M.S.da. CETEM, RJ, 2002.
- CARVALHO, D.F.; MARCHI, D.D.; DURRANT, L.R. Surface Active Emulsifying Agents Produced by ... Área de **Microbiologia** de Alimentos .... Anais do XVI **Congresso Brasileiro** de Ciência e Tecnologia de Alimentos. ... 20(4): 245-248 (1997). ... **19**, p. 65-67, Campinas, 2001.
- CUNHA, G.R., Propriedades reológicas de exopolissacarídeos produzidos por bactérias dos generos *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, **Semina: revista cultural e científica da Universidade Estadual de Londrina**, v. 20-21, p. 68, 2008.
- DIAS, M.V.B., ELY, F., CANDURI, F., PEREIRA, J.H., FRAZZON, J., BASSO, L.A., PALMA, M.S., De Azevedo, W.F., & Santos, D.S. (2004). Acta Crystallogr. Sect. D.-Biol. Crystallogr. 60, 2003-2005.

DOMINGUEZ, J.M.L.; MARTIN, L.; BITTENCOURT, A.C.S.P.; LEÃO, Z.M.A.N. - Capítulo VII - **Geologia do Quaternário Costeiro e Plataforma Continental. In: Projeto Costa do Descobrimento** - Companhia Baiana de Pesquisa Mineral, Salvador, 1 ed. 2000.

FÁVERO, K.B., FENNELL, D.I., *The genus Aspergillus*, Baltimore, USA, The Williams & Wiks CO., 1999.

GRUSE, W.A.; STEVES, D.R., **Chemical technology of petroleum**, New York, London: McGraw-Hill Book Company inc., p.194, 1960.

HUESEMANN, M.H., "Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils", **Journal of Soil Contamination**, v. 3, n.3, p. 229-318, 1994.

MULLIN, J. W. *Optimização da unidade de cristalização do clorato de sódio Crystallization; Butterworths; University of London; fourth Edition, 1961.*

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Quím. Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

QUINTELLA, C.M.; KORN, M.G.A.; NETO, P.R.C.; TORRES, E.A.; CASTRO M.P.; JESUS C.A.C. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Quím. Nova**, v. 32, n. 3, p. 793-808, 2009.

RODWELL, V.W., *Catabolism of Proteins & Amino Acid Nitrogen. Biomedical Importance*, Japão, n. 28, p. 246, 2009.

ROSA, A.P., **Processos de biorremediação na mitigação do impacto ambiental, devido a eventuais derrames de óleo na bacia de campos - experimentos laboratoriais**. Tese (Mestrado em Engenharia de Reservatório e Exploração de Petróleo) - Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, p.145, 2001

UNA, G.V., GARCIA, M.P.N. Biodegradation of non-ionic dispersants in sea water. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.18, p. 315-319, 1983.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, Instituto de Química, Cristina M. Quintella, Odete Gonçalves, **Processo de obtenção de produto biodegradável para aplicação na remediação de solos, águas e ambientes impactados e método de funcionamento**. BR n. PI 1004444-2 A2, 2010.

## 5. DESCRIPTION OF A BIOREMEDIATION PROCESS USING *Ricinus communis* AND FILAMENTOUS FUNGI AND MICROBIOLOGICAL MIXTURE

Odete Gonçalves<sup>a</sup>, Cristina M. Quintella<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Núcleo de Estudos Ambientais, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brazil.

<sup>b</sup> Institute of Chemistry, Federal University of Bahia (UFBA), Campus de Ondina, 40170-290, Salvador, Campus de Ondina Bahia, Brazil.

\*Corresponding author

### ABSTRACT

This paper describes natural cleaning processes of crude oil contaminated area and the entire metabolic processes. The bioremediation done by *Ricinus Communis* accelerates the biodegradation of hydrocarbon contaminants and reduces the concentration or the toxicity of these compounds.

The energy from *Ricinus Communis* absorbed by *Aspergillus flavus* and *Penicillium* fungi is transformed on cellular membrane that facilitates the nutrients absorption from oil-contaminated sediments thus enhancing the filamentous web to growth. This is the initial path to transform the contaminants into a biopolymer and further enhancement based on degraded hydrocarbon trap on its structure.

The proposal has a high potential to be used as marine conservative procedure of offshore nearby site since the recovery of oil-contaminated sediments can be achieved using environmentally available fungi and the final product is a biopolymer that can also be used in another industrial segments. Also, the usage of *Ricinus communis* from castor oil has a good environmental impact and sustainability aspect since it can be obtained as a reject of biodiesel production.

**Keywords:** Bioremediation, Fungi, Protein biopolymer.

### 5. 1 Introduction

It is known from the specialized literature that mangroves are coastal ecosystems that occur in the sheltered waters of the rivers meet the sea water and is therefore subject to tidal regime. They develop in regions of high temperature and its vegetation is rich in diversity, consisting of trees and shrubs belonging to families that have a high tolerance to salt and brackish waters and precipitation on land appropriated.

Mangrove ecosystems are highly sensitive to human disturbances such as contamination by oil or other toxic products, which can cause damage to the entire biota, having a high impact in the long term.

The removal of a pollutant source from one location, however, does not mean the discontinuation of its impacts, because the accumulation of toxic substances in the environment can have its effects multiplied, reaching even human health. In the event of oil contamination, it may persist in the mangrove ecosystem for years. Furthermore, techniques for cleaning or removing oil are limited.

In this sense, it can be stated that bioremediation is a technique that shows promise for the recovery of contaminated wetlands (XU, *et al.*, 2005). For this purpose, this paper describes a natural cleaning processes of crude oil contaminated area and the entire metabolic processes, accelerating the biodegradation of natural contaminants and reducing the concentration or the toxicity of these compounds.

The contamination by petroleum hydrocarbons and other sources are disorders that modify the natural environment and its capacity for self. In this perspective, it is seen that the greatest benefit from the application of bioremediation mineralization is the final product obtained as CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O through aerobic as well as the formation of biomass.

The conversion of hydrocarbons can be facilitated by the microorganisms for the production of enzymes as organic catalysts which control the biochemical reactions, producing energy and equipment necessary for the proliferation of new microbial cells (UÑA *et al.*, 1983).

The fungi produce extracellular oxidative enzymes capable of breaking polycyclic aromatic compounds and long chain transform them into compounds that can be captured to its metabolism. These enzymes hydrolyze peptide bonds, releasing peptides are degraded by peptidases to free amino acids (RODWELL, 2009). Importantly also, the studies indicate that increased bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), increasing the rate of solubilization of heavy metals and increased naphthalenes solubilization by the use of biosurfactants (NITSCHKE *et al.*, 2002).

Bioremediation through processes of oxidation-reduction is the degradation and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenolic compounds in mangrove soil impacted with petroleum and others. This occurs when the process of transformation of substances, initially, in fermentation, emits gases dispersion (smaller particles). Then gives the effect of the emulsion by passing the water soluble particles in ion exchange and finally occurs, the substrate, the physical-chemical changes produced by the microorganisms for their metabolism and uptake.

The fungi that are present in everyday life, have a vegetative body called stem or sum which is composed of fine-celled filaments called hyphae. These form a microscopic network

within the substrate (food source), called the mycelium, through which food is absorbed. The mycelium can be cenocítico or septated. The fungal cell is a structure similar to animal cells, but with distinct cell wall (MANCERA-LÓPEZ *et al.*, 2008).

As a result, the present paper describes the microbiological process for the production of biopolymer protein, obtained in the form of a tough, gelatinous film. More specifically, we demonstrate how the production of biopolymers compressed film was filamentous, from mangrove sediment contaminated with hydrocarbon oil. These vegetable proteins are like energy stored in cells of the fungi that metabolize these materials and return the environment to residual synthesized.

## 5.2 Experimental Section

The research was carried out in the field laboratory, located near the estuary of the river São Paulo. This laboratory unit, which is as an extension of the Laboratory Oil Study (LEPETRO), is called "Laboratory of Simulation of Bioremediation Processes" (LEPETRO - SIMULATION). We also work at the Center for Environmental Studies (NEA), the Institute of Geosciences (IGEO / UFBA), together with the LabLaser - Laboratory of Molecular Kinetics and Dynamics of the Chemistry Institute (IQ / UFBA).

### 5.2.1 *The study area*

The study area is representative of the system in the Atlantic Forest biome mangrove ecosystem, part of the sedimentary basin Recôncavo (limited by the failure of Salvador in the east, and Maragogipe, west) as lithological units that make up the basin. The rock units that make up the basin are essentially composed of sequences of conglomerates, sandstones and shales (Rosa, 2001). This sedimentary package rests on the Precambrian Basement, composed for the most part, granulites and migmatites of Archean Age Granulite Belt that constitute the Atlantic, and on metasediments Brasileiro training office.

### 5.2.2 *The oil Recôncavo Baiano*

As for oil Recôncavo, due to its origin, from raw lake, has dominant composition of normal paraffin and chains differing thus oil from other sedimentary basins (BORGES *et al.*, 2007). As a result, the precipitation of paraffin gradually decreases the flow of oxygen sediment mangrove, causing contamination of sediments within the compact and, therefore, impairing the remediation process.



Sulfur is the third most abundant element found in the oil, with concentration of 0.65% by weight and a strip which has values between 0.02 and 4.00%. This element can occur in petroleum in the form of sulfides, polysulfide, benzothiophenes and derivatives, polycyclic molecules with nitrogen and oxygen, hydrogen sulfide, carbon disulfide, carbonyl sulfide and elemental sulfur.

The tracking of sulfur content is an important link of the entire remediation process from larger molecules cracked into thin protein film.

### 5.2.3 *The bioremediation process*

To simulate the process of bioremediation used a consortium of by-products of a second generation of biofuels - crude glycerine and castor bean - used as biostimulation and associated with fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium* spp or other fungal species with vegetable protein inhibits ricin from castor oil in the process of alcoholic fermentation.

It should be noted the use of castor oil, derived from *Ricinus communis*, as a source of energy for heterotrophic microorganisms, modifying enzyme activity in addition to promoting the absorption of mineral compounds and some inhibit the effects of toxins (CAVALCANTI, 1998). Ricin is a ribosome inactivating protein (RIP) of type II heterodimeric with ribosome inhibiting the enzyme (~ 32 kDa-chain or RTA) linked by a disulfide bridge lectin galactose (~ 34KDa, or TCR B-chain). On the other hand cysteine protease is a metal using a metal ion in their catalytic mechanism and hydrolyzed proteins into amino acids by facilitating their absorption by the cells, since it has a role of undo the polymerization process. (ALVAREZ-SÁNCHEZA *et al.*, 2000).

### 5.2.4 *The process of producing the synthesized film*

The aforementioned process of production of the film by a synthesized amide group film with protein molecules and minerals consisting of:

- a) microbiological prepare a mixture containing between 80-85% of mangrove contaminated with oil, 1-5% of crude glycerine, 1-6% of castor bean and 5-10% of water production;
- b) seed strains of filamentous fungi selected from *Aspergillus flavus* and *Penicillium* spp or other species of filamentous fungi;
- c) injecting the mixture plated on microbiological pipes fitted with screen contention in its bottom for storing composite samples, taken from the mangrove substrate, said pipes being distributed in tanks containing saline;

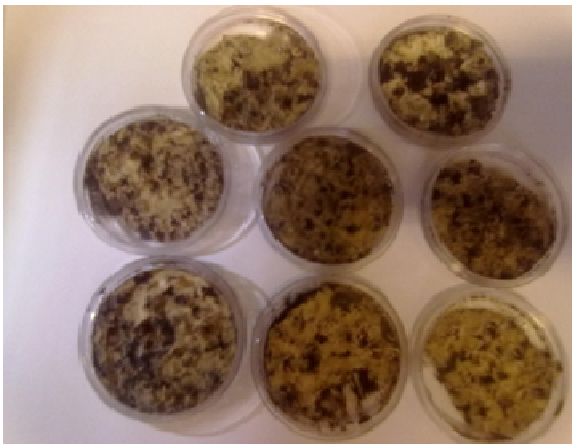
d) Rest time for fungal proliferation and the formation of the biopolymer.

### 5.2.5 Sowing

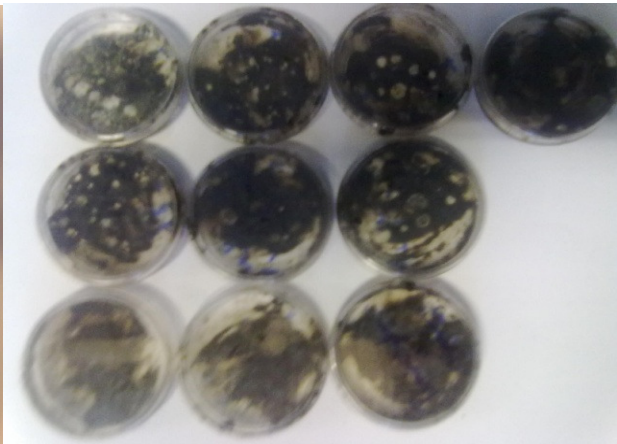
Sowing in petri dishes are used as comparative samples with the fungal species (figures 1 and 2). The procedures performed in the pre-tests and to obtain the samples for seeding are as follows:

- 1) Weigh and / or measure each of the systems listed above and preparing the mixture in its pre-established standards;
- 2) Take the heater magnetic stirrer in 200 mL beaker with temperature to 85 ° C for 3 min;
- 3) Remove the mixture from the shaker and add specific strains of the fungus has been identified;
- 4) Seal and identify in petri dishes;
- 5) Track incubation and development of fungi.

**Figure 1:** Sowing of *Aspergillus flavus*.



**Figure 2:** Seeding of fungi *Pinicillium* sp.



With these procedures, the mixture is obtained ready to be sown microbiological sediment mangrove (figure 3)

**Figure 3:** Mixture microbiological ready for sowing.



#### 5.2.6 The bioremediation experimental set up.

The bioremediation process was carried out in field aquaria containing test tubes inside for storage of these composite samples, taken from the marsh substrate. For this, sediments were collected, homogenized and used to compose the mixture responsible for microbial bioremediation performed.

The mixture prepared for microbiological assay had the following composition (w/w): 600 g of petroleum contaminated substrate mangrove exudate; 24.60 g crude glycerine, 34.40 g of castor bean and 50 mL water production, adding more strains of the fungus.

The components were weighed and mixed under stirring with heating at a temperature in the range of 85-90 ° C for 4 minutes to solubilize the oil. It was then placed in the pipes and added the fungus - *Aspergillus* spp or *Penicillium* spp or other mold species. The screen bottom containment pipes allows the release of substances into the ion exchange tank containing the saline solution.

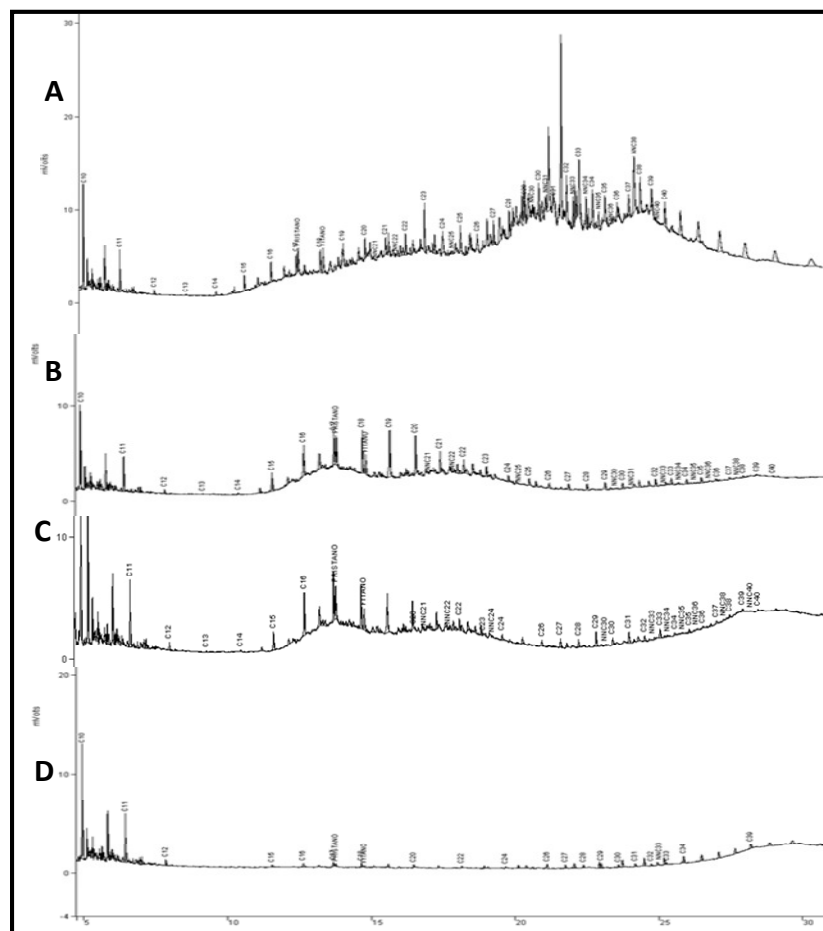
Analyzes were performed initially Chromatography HPLC to identify the white mangrove sediment reference samples, sand ash, crude glycerine and castor bean. It was subsequently analyzed by X-Ray Fluorescence mangrove the pellet, reference, and the product biopolymer membrane produced in dry form and gelatin. Furthermore, it was investigated in the product Infrared biopolymer. With data from such minerals, we obtained Covariate Statistical Analysis Data - PCA, aiming to identify the products in biochemical processing.

Furthermore, it was investigated in the product Infrared biopolymer.

### 5.3 Results

With the initial analysis of the white reference HPLC chromatography was: obtained (Figures 4 A, B, C, D). The component sediment contaminated marsh (Figure 4A), after characterization by liquid chromatography, generated when the reference white is observed the larger profile for C33 hydrocarbons to 519.73 ppm, then C38 420.43 ppm with long-chain, linear-chain alkanes smaller, C10, with a concentration of 262.82 ppm 84.70 ppm for the biomarkers pristane and concentration of 115.69 ppm for phytane. The chromatogram calcined sand not observed peaks that have relevance (Figure 4B). In the case of crude glycerine with its residual organic surfactant and which reduces the interfacial tension, which also favors microbial growth and colonization, one can observe the predominance of short chain hydrocarbons up to C11(Figure 4C), aromatic and few that do not represent index of contamination of the pellet mangrove. The castor bean cake, one can see that has peaks organic substances which form the amino acids of the protein ricin which modifies the enzymatic activity and favors the soimbilização of mineral compounds (Figure 4D)

**Figure 4:** Presentation of chromatograms of reference components of the mixture Microbiological. **A)** Chromatogram of the total hydrocarbons in mangrove sediments. **B)** Chromatogram of areis burned. **C)** Chromatogram of crude demonstrating that glycerin has hydrocarbons which do not constitute rate of contamination. **D)** White reference chromatogram of castor bean waste.



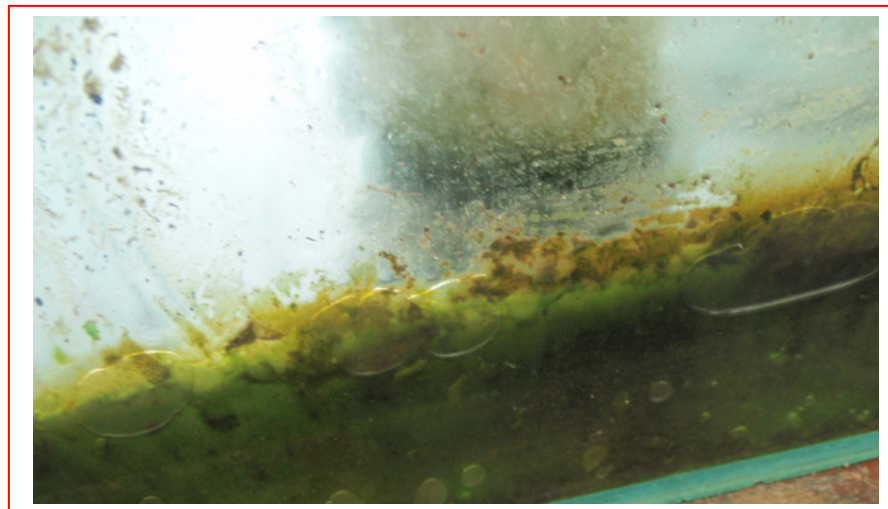
It was observed that the simulation with the *Aspergillus* spp and / or others, with the castor bean biostimulation generated, on top of the brine, a layer of fat emulsion, which has become dark and turbid in the following days (figure 5). The fermentation and the formation of the emulsion still occur as the film forming was, the saline solution became clear, without foam, but with some lime green, and residual sediment at the bottom.

**Figure 5:** Aquariums with mixed microbial highlighting the dark color of the solution before forming the film.



After 35 days, has formed a film at the bottom. At the top, the pipes were very proliferation of fungi with bursts of yellow, indicating the presence of sulfur or other minerals (figure 6).

**Figure 6:** Generation of the film in saline.



At 50 days, the sediment within the pipes is found drier result of the hydrolysis of ricin cysteine a metallo protease, due to the process of removing the microbial pellet oxygen to their energy, dehydrating the pellet. By adding sodium hypochlorite (for cleaning the film), it was observed that the color changed from green to yellow, and fermentation with release of

gas bubbles in the saline solution.

As a mean of bioremediation of contaminated sediment, resulted by the action of fungi, PAHs in the transformation of substances into smaller molecules and volatile, posted to the saline pollution, come to react with the enzyme of the plant protein ricin from castor beans. Therefore, substances which are degraded and the volatiles are captured for the production of biopolymer.

Were monitored physical-chemical parameters in the unity of the agent simulation with *Aspergillus* spp, with bio-stimulation crude glycerin and castor bean meal during the 8 weeks (table 1)

**TABLE 1.** Physico / chemical simulation with *Aspergillus* spp crude glycerine and castor bean, monitored for 8 weeks.

PHYSICAL / CHEMICAL <i>Aspergillus</i>	WEEKLY COLLECTION						
	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>	6 <sup>th</sup>	7 <sup>th</sup>
Time h	10:50	10:50	10:20	10:33	11:15	10:50	10:35
Temperature Environment (° C)	29.9	27.7	29.2	27.5	29.6	26.6	25.5
pH	6.48	7.30	7.4	8.10	8.26	8.49	8.50
OD (mg/L)	2.7	4.8	6.6	8.2	3.2	2.0	-
Salinity	30	27	22	35	40	48	15
Eh (Mv)	56	17	-3	-35	-43	-57	-53
Conductivity ms/cm	47.7	57.3	49	58.4	75.2	84	30.6

The sample collections were made in the morning, between 11:15 and at 10:30. The temperature ranged from 25.5 ° C and 29.9 ° C in saline that only covered the bottom until it hits about 10 cm in the tube with sediment, which is normal for the tropical climate. Initially and at the end as shown in the literature, the acid pH has proved, however, during the period of greatest bioremediation remained neutral between 7.5 and 8.0. The Eh started with 56 (Mv) and highlighted with final minimum -99, which shows the process of bioremediation.

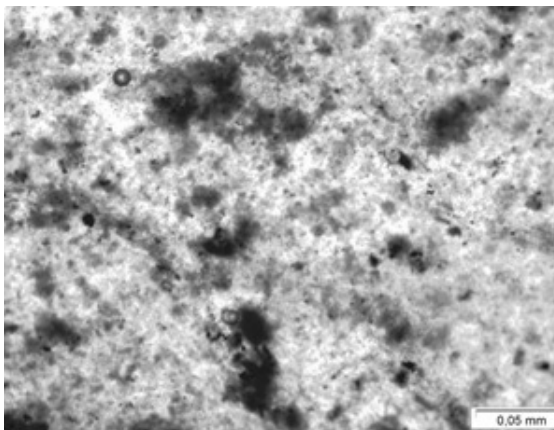
The data on pH and redox potential (Eh) are parameters that must be observed in marine systems to ascertain information about variations in geochemical and environmental conditions on trends of degradation of hydrocarbons (table 2).

**Table 2.** Physico / chemical simulation *Penicillium* spp with crude glycerin and castor bean, monitored for 8 weeks.

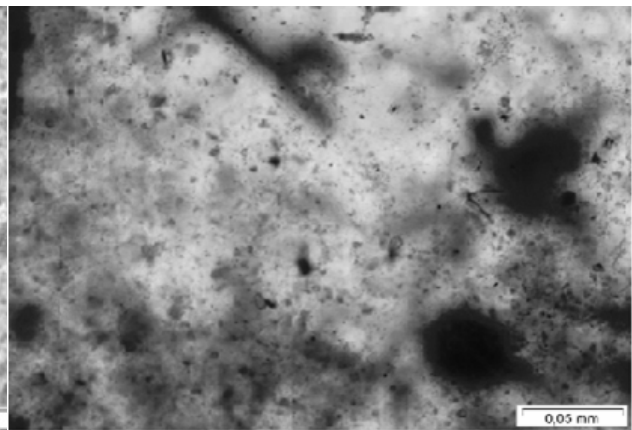
PHYSICAL/ CHEMICAL	WEEKLY COLLECTION						
	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>	6 <sup>th</sup>	7 <sup>th</sup>
<i>Penicillium</i> spp							
Time h	11:00	11:10	10:30	10:50	10:55	11:10	10:40
Temperature Environment (° C)	27.7	27.5	29.1	27.5	29.4	26.9	24.4
pH	6.31	6.75	7.2	8.45	8.31	8.76	8.02
OD (mg/L)	2.7	3.6	1.2	8.5	4.2	2.8	-
Salinity	27	25	25	30	36	50	6
Eh (Mv)	66	40	11	-51	-45	-72	-43
Conductivity ms/cm	50.7	50.1	29	59.1	78.1	85.3	29.2

The development of thin film produced by *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp species was observed during the period of 8 weeks on the experimental mixture microbiological bioremediation aquarium field (figures 7 and 8).

**Figure 7:** Photography Film biopolymer produced by *Aspergillus* spp.



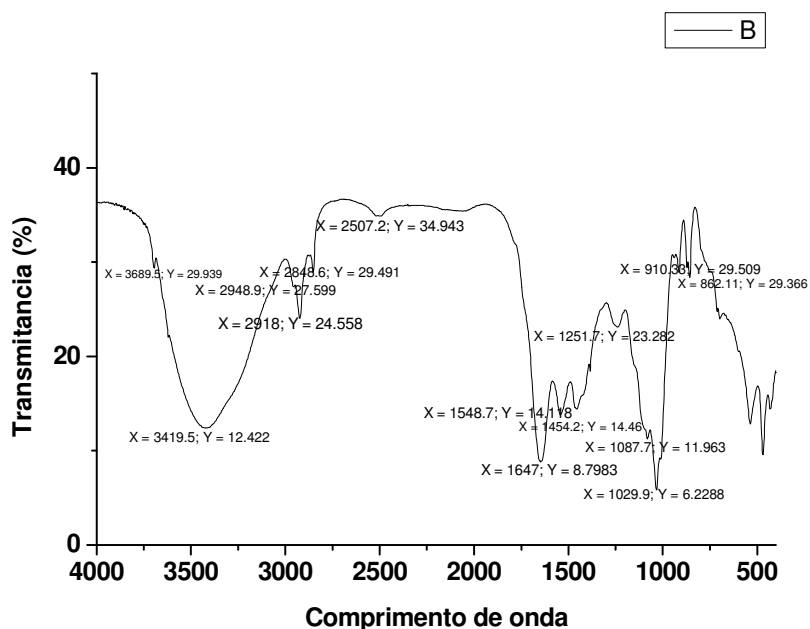
**Figure 8:** Photography Film biopolymer produced by *Penicillium* spp.



To follow the development of the thin film produced by the fungi was performed a cleaning treatment in the membrane with sodium hypochlorite and dichloromethane, and then allowed to evaporate, thus allowing the film to remain dry.

This sample was analyzed in Infrared (figure 9) for analysis of organic and fluorescence X-rays for inorganic analysis and found to have decreased and the organics gave a higher yield of mineral elements.

**Figure 9:** Infrared spectrum resulting from the analysis of the biopolymer film.



Were identified in the film of a biopolymer with organic amide enzyme protein wave number (cm-1) 3419 NH associated with secondary amines, at a wavelength of 2848 to 1647 in the amide C = C and aromatic NO<sub>2</sub> vibration band at 1548 strong 1087 and from S = O (sulfoxide) and halogen compounds in alpha.

Complementing the research, the biopolymer protein produced by *Aspergillus* spp was analyzed in the gelatinous form, in X-Ray Fluorescence. Through this was obtained 99.8% of organic material and only 0.2% of inorganic minerals, sulfur distributed among 0.05, 0.04 Calcium, Potassium and Iron 0.04 0.02, Titanium 0.009, 0.007 Bromine, Chromium 0.001. In addition, new groups of minerals such as chlorine, gallium, arsenic and ruthenium oxide contribute in reactions / reduction for biochemical processing. The result of elementary qualitative the biopolymer becomes more resistant, film, microbiological organic..

To the fungus *Penicillium* with the protein *Ricinus Communis*, in turn, found that consists of 98.88% and 1.12% organic material consists of mineral distributed among sulfur 0.55%, Ca 0.39, silicon 0.07, Iron 0.05 and Potassium 0.04, 0.009 Titanium and Manganese 0.003..

The fluorescence X-rays can detect existing elements in mangrove sediments that, somehow, are working with the hydrocarbon contaminants in this area. From there, it is

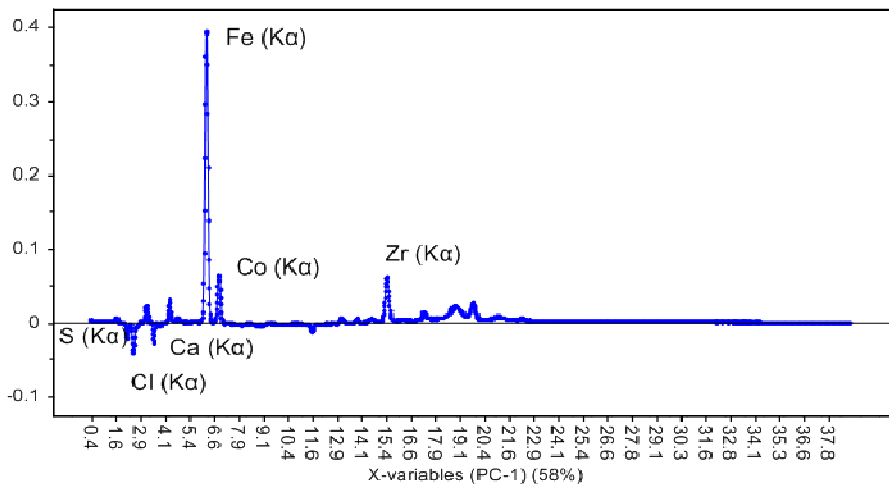


possible a more accurate study in order to understand the interactions and chemical reactions that occur in contaminated mangrove environment.

Statistical analysis was done Principal Component Analysis - PCA was obtained in which the separation of the white frame with minerals and microbiological contaminants from the mixture of products derived from this. The biopolymer membrane product stand out at lower values, focusing more on negative. These variations in compounds contained in mineral samples claim biochemical changes which occur allied to the volatile contaminants of low molecular weight (figure 10).

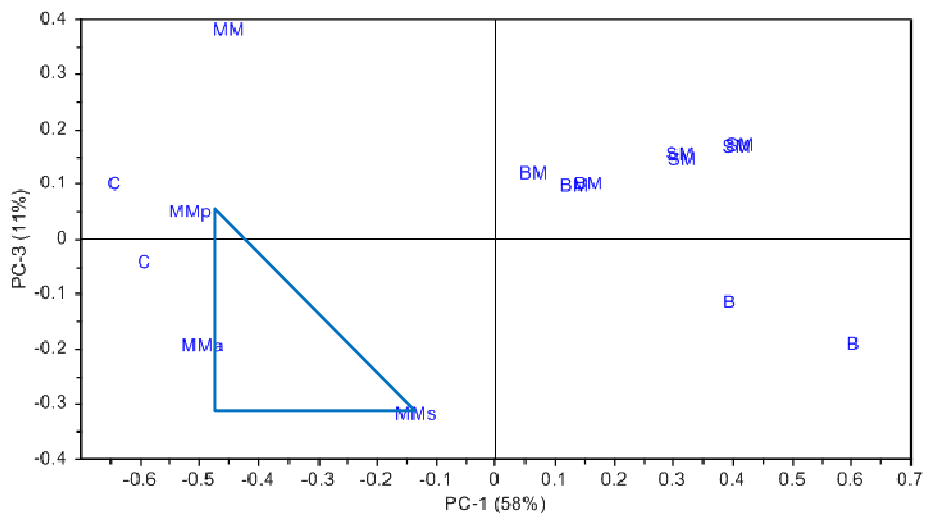
### Chart loadings

**Figure 10:** Chart Loadings showing the main metal compounds containing the mixture microbiological.



The statistical analysis PC by X-Ray Fluorescence was obtained the elements of the film membrane of biopolymers of the saline solution by the action of fungi transformed with the plant protein *Ricinus communis* (figure 11), separating the products of the sample sediment.

**Figure 11:** PC results of statistical analysis by Fluorescence X-Rays.



From this analysis, it can be seen highlighting the inorganic mineral elements that contribute to the composition of the biopolymer film membrane, whose chemical composition is made up of 99.822% organic material (CHO) and only 0.2% Sulfur minerals distributed among 0.053%, 0.041% Calcium, 0.041% Potassium, 0.025% Iron, 0.009% Titanium, Bromine and 0.007% 0.001% Chromium.

#### 5. 4 Discussion

The growth of microorganisms in an interface of oil and water encourages the development of a biofilm, in which the microorganisms adhere to the surface of large oil drops due to the hydrophobicity of cells including forming a thin interface, extracting the water insoluble compounds the oil phase, using mineral salts from the aqueous phase. As the cells lining the drops of oil producing biosurfactants, reduces the interfacial tension, which favors the growth and microbial colonization (MARTINS, 2005).

The filamentous fungi are more efficient in the production of extracellular oxidative enzymes, among them proteases, cellulases, and other ligninases (SANTAELLA, 2009). By the process of protease enzymes, the metal particles that compose them, are exposed to a greater amount in the aqueous saline, allowing an increase of nanometric fractions that, regroup, interact, leading to mineralization of the substrate. The fungi energy is absorbed and transformed on cellular membrane that facilitates the nutrients absorption thus enhancing the filamentous web to growth. This is the initial path to produce the biopolymer and further enhancement based on degraded hydrocarbon trap on it structure.

This result allows us to state that this microbiological organic film from *Aspergillus* spp is more purified naturally, with the lowest residual impurity thinner and compact. no silicate) according to XRF data. This is due to vegetal biofilm formation produced by *Ricinus communis* already known by technical literature. However, with *penicilum* fungi the biofilm synthesized with high silicate content that makes it more robust but less elasticity aspect.

The biofilm formed by fungi mineral Titanium proved to be the same percentage in films formed from both fungi., since a inert mineral, it was revealed that it contributes to the non-rejection in organisms as Titanium has proven to inert for prosthesis application.

From the described procedure, could be demonstrated that the product of proposed bioremediation is a biopolymer with a microbial resistant material and gelatinous membrane film that can be applied in several areas of medical biotechnology as example advanced bone transplant.

In a second aspect, enables both a process of electron transfer between proteins of Iron/Sulfur as to obtain a product biopolymer emulsified in saline for use inside ducts, enabling the protection of steel and fluidity of the oil. In summary, it offers a process to obtain a film coating for corrosion employment of metallic pipes in the transport and petrochemical industry.

Depending on future applications of those biopolymers, the mechanical properties can be selected and target during the biopolymer synthesis.

## 5. 5 Conclusions

The proposal has a high potential to be used as marine conservative policy of offshore nearby site since the recovery of oil-contaminated sediments.

The *Aspergillus flavus* and *Penicillium* fungi degrade the oil-contaminated sediments, used in its metabolism, and returns it as a synthesized biopolymer to the environment which has a wide variety of application in the products and coatings industry and in the medical area.

Further studies in biotechnological research area are required to explore the proper applications.

## Acknowledgements

The authors thank the opportunity to LabLaser / UFBA by XRF analyzes of sediment bioremediated, the Laboratorio IGEO NEA / UFBA, for giving the facilities of the experimental field of chromatography and analysis, the Analysis Laboratory of Toxicology IBIO / UFBA by isolation and identification fungi, the Polytechnic Institute UFBA by glycerine and castor pie and CNPq funding agencies.

## References

- Alvarez-Sánchez, M.E., Avila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facendab, L.V., Ortega-López, J., Arroyo, R., 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity, *Microbial pathogenesis*, 28, p. 193-202.
- Borges, S.M.S., Lima, A.M.V., Musse, A.P.S., Almeida, P.M.M., Quintella, C.M., secondary recovery of heavy oil reservoirs and completion of mature fields using the product (crude glycerine) of biodiesel production. **Technical Bulletin of Oil**, n. 2, p. 131-152, 2007.
- Cavalcanti, F.J.A., 1998. Fertilizer recommendations for the State of Pernambuco: 2nd approach. Pernambuco Agricultural Research Company.
- Goncalves, O., Quintella, C.M., Trigui, J.A., 2011. Patent 221109478199 - Process for obtaining biosensors and biosensors.

- Mancera-López, M.E., Esparza-Garcia, F.F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez-Vázquez, R., Saucedo-Castaneda, G., Barrera-Cortés, J., 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 61, 151-160.
- Martins, V.G., 2005. Production of biosurfactant by solid state fermentation and their use in bioremediation. Dissertation (M.Sc. Food Science and Engineering) Federal University of Rio Grande.
- Nitschke, M., Pastore, G.M., 2002. Biosurfactants: properties and applications. *Chem. New*. 25, 772-776.
- Quintella, C., Gonçalves, O., 2010. Process to obtain biodegradable product for use in the remediation of soil, water and impacted environments and operation method. BR n. PI 1004444-2 A2, 03 March 2010.
- Rodwell, V.W., 2009. Catabolism of Proteins & Amino Acid Nitrogen. *Biomedical Importance* 28, 205-209.
- Rosa, A.P., Triguís, J.A., 2006. Estudos Experimentais da Análise do Processo de Biorremediação na Mitigação do Impacto Ambiental. *Geochemica Brasiliensis*, 20(1)005-013, 2006
- Santaella, S.T., Silva Júnior, F.C.G., Gadelha, D.A.C., Costa, K.O., Aguiar, R., Arthaud, I.D.B., Leitão, R.C., 2009. Treatment of petroleum refinery effluents in reactors with *Aspergillus niger*, *Ambient Sanit Eng* 14, 139-148.
- Uña, G.V., García, M.J.N., 1983. Biodegradation of non-ionic dispersants in sea water. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 18, 315-319.
- Xu, R., Lau, A.N.L., Lim, Y.G., Obbard, J.P., 2005. Bioremediation of oil-contaminated sediments on an inter-tidal shoreline using a slow-release fertilizer and chitosan. *Marine Pollution Bulletin* 51, 1062-1070.

**Observação:** “Este artigo encontra-se nas normas da revista na qual se tem a intenção de ser publicada”. Revista: *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier.

## 6. PRODUÇÃO DE BIOSENSOR DERIVADO DE COMPONENTES VOLÁTEIS ENCONTRADOS EM MANGUEZAIS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS

O. Gonçalves<sup>1</sup>, Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria Quintella<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.*

*e-mail:*<sup>1</sup>[odetegoncalves7@hotmail.com](mailto:odetegoncalves7@hotmail.com); *e-mail:*<sup>2</sup> [Cristina@ufba.br](mailto:Cristina@ufba.br)

**RESUMO:** O presente trabalho apresenta o processo de obtenção de um produto salino cristalizado que encerra em sua composição uma enzima proteica com características capazes de produzir biossensores, cuja aplicação na indústria farmacêutica, medicinal, biotecnológica e eletrônica é recorrente. A reação de cristalização ocorre em meio salino de contaminantes voláteis de manguezais contaminados com hidrocarbonetos, quando submetidos ao processo de volatilização da biorremediação com fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, dentre outros. A difusão do contaminante na fase gasosa torna-se efetiva na proliferação dos fungos na mistura microbiológica para biorremediação envolve reações oxidativas, redutivas e hidrolíticas. Os produtos obtidos possuem características eletromagnéticas, detectados por meio de fluorescência de raios-x, difratometria e FTIR.

**PALAVRAS-CHAVE:** Enzima proteica. Biossensor. Biorremediação.

### 6. 1. INTRODUÇÃO

A biorremediação é um processo conduzido pela ação de microrganismos como bactérias e fungos, que utilizam os hidrocarbonetos como nutriente, tornando-se principais agentes da descontaminação de ambientes impactados por petróleo. As contaminações com hidrocarbonetos são distúrbios que modificam o ambiente natural e sua capacidade de auto-renovação [QUINTELLA, C.M., TEIXEIRA, L.S.G., KORN, M.G.A., COSTA NETO, P.R., TORRES, R.A., CASTRO, M.P., JESUS, C.A.C., 2009]. Neste sentido, vê-se que o benefício maior da aplicação da biorremediação, isto é, aceleração do processo de biodegradação, é a mineralização que obtém como produto final CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pela via aeróbica, assim como formação de biomassa [CUNHA, 2008]. Portanto a biodegradação é um método biológico processado por microrganismos, que através de seu metabolismo, efetivam a biotransformação de moléculas orgânicas em outras menores.

Os acidentes com derramamentos do petróleo, geralmente, afetam as praias, sendo carregado pelas correntes marítimas até os manguezais, aonde vem a ser letal para uma variedade de formas de vida, dentre elas, plâncton, peixes e mariscos, pássaros e mamíferos marinhos.

A área onde foi coletado o sedimento manguezal utilizado neste experimento, situa-se entre os municípios de Madre de Deus, Candeias e São Francisco do Conde, localizados no estado da Bahia, e é representativa do Bioma Mata Atlântica, no ecossistema manguezal. Contudo, encontra-se nas proximidades da zona de produção, refino e transporte do petróleo da Refinaria Landulfo Alves - Mataripe (RLAM), o que, conseqüentemente, expõe esta região a acidentes oriundos da atividade petrolífera.

Com o aumento da produção da indústria petrolífera, estes acidentes acontecem com frequência e envolvem, cada vez mais, maiores áreas contaminadas por hidrocarbonetos, necessitando de medidas tecnológicas de limpeza. Neste cenário, a biorremediação apresenta-se como uma técnica vantajosa, principalmente, por ser de baixo custo com relação a outras técnicas de biorremediação como translados do sedimento contaminado, processos físico-químicos como Air Stripping/Sparging, extração de gás do solo (SVE), adsorção por carbono, oxidação química, entre outras.

A transformação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos pode ser facilitada através da produção de enzimas como catalisadores biológicos, as quais controlam as reações bioquímicas, produzindo energia e material necessários para a proliferação de novas células microbianas [UÑA, GARCÍA, 1983].

Nesse sentido, os fungos produzem enzimas extracelulares oxidativas, capazes de quebrar compostos policíclicos aromáticos de cadeia longa e transformá-los em compostos assimiláveis ao seu metabolismo. Estas enzimas hidrolisam ligações peptídicas, liberando peptídeos, que são degradados a aminoácidos livres pelas peptidases [RODWELL, 1999]. Importante salientar, também, que estudos indicam o aumento da biodisponibilidade de policíclicos aromáticos (HPAs), aumento da taxa de solubilização dos metais pesados e aumento de solubilização de naftalenos pelo uso de biossurfactantes [NITSCHKE, PASTORE, 2002], [MARIANO, (2006)] assegura que para algumas aplicações, a bioestimulação de microrganismos autóctones é a melhor escolha, considerando o custo e desempenho. É conhecido ainda que as proteínas surfactantes possam interagir com os antígenos glicosilados de *Aspergillus* spp.

O *Penicillium* spp, é um gênero de fungos conhecido como o comum bolor do pão que cresce em matéria orgânica morta. Várias espécies produzem bactericidas (antibióticos) que permitem ao fungo lutar contra a competição violenta das bactérias saprófitas pelo alimento. Pitt, 1985, e Cerniglia, 1997, apontam a capacidade de degradação de hidrocarbonetos por estes fungos, uma vez que metabolizam os HAPs que possuem dois a seis anéis aromáticos, tais como o hidrocarboneto Pireno com quatro anéis e o Benzo(a) pireno com cinco anéis.

De acordo com Melo, 2008, o uso de enzimas para fins analíticos ocorre desde a década de 60 quando estudiosos utilizaram uma enzima aliada a um eletrodo para determinar a glicose, objetivando controlar o diabetes. Posteriormente, os dispositivos criados com a junção de uma enzima com um eletrodo receberam o nome de “eletrodos enzimáticos”. Com o desenvolvimento intensivo na busca por novos sensores físico-químicos, em especial, utilizando-se reações enzimáticas variadas, foi introduzido o termo “biossensor”, mais genérico e abrangente.

Salgado, 2001, define os biossensores como um tipo particular de sensor químico que usa um componente biológico na camada sensível, acoplado a um transdutor de sinal, a fim de se obter uma resposta específica. Consoante o autor, eles podem ser indicados para detectar pequenas concentrações de determinado analito, ou ainda para apontar características fisiológicas ou bioquímicas de uma determinada amostra.

Diante dos novos desafios da economia petrolífera, o produto biossensor vem abrir portas para inovações orgânicas da ciência na gestão de negócios com desenvolvimento sustentável no campo, além de promover responsabilidade social com emprego e renda.

Nesta perspectiva, objetiva-se, neste trabalho, apresentar o processo de obtenção de um produto salino cristalizado, Cristal de Halita, que possui características de formar compostos com ligações iônicas. Encerra ainda em sua composição uma enzima protéica Amida, capaz de produzir biossensores cuja aplicação na indústria farmacêutica, medicinal, biotecnológica e eletrônica é recorrente.

## **6. 2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **REALIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOSENSORES**

Para tanto, e no tocante à delimitação do problema, a área de estudo encontra-se na porção nordeste da Baía de Todos os Santos (BTS), considerada a maior e mais importante baía navegável do litoral brasileiro, às margens do Rio São Paulo, próximo à estação Pedra Branca, nas coordenadas 12° 44' 26,0”(S) e 38° 31' 53,9<sup>(w)</sup>, o qual deságua na BTS. Além disso, a área estudada, situada entre os municípios de Madre de Deus, Candeias e São Francisco do Conde, é representativa do Bioma Mata Atlântica, no ecossistema manguezal. No entanto, encontra-se nas proximidades de zona de produção, refino e transporte do petróleo da Refinaria Landolfo Alves - Mataripe (RLAM) (Figura 01). Por consequência, esta região está exposta à possibilidade de acidentes oriundos da atividade petrolífera.

**Figura 01** – Mapa da Área de Estudo e Foto Localização. a) Mapa de Situação e Localização da Baía de Todos os Santos. b) Fotografia da área de coleta de sedimento



**Fonte:** Adaptado de Bahia (2004).

O processo para produção de biossensores foi obtido a partir do crescimento de cristais de halita na superfície das amostras em placas de Petri, após o período de 90 dias da semeadura de fungos para biorremediação de manguezal. Estes foram resultantes da proliferação e concentração da população fúngica, nos quais se desenvolveram acima dos esporos, como fragmentos cristalizados, sólidos, transparentes e com brilho. Foram utilizados os fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, o cristal analisado para orgânicos em FFTIR, mostrou ser um Cristal Proteico Amida, obtido de contaminantes voláteis.

A Difractometria de Raios-X consiste em fazer passar um feixe de raios-x através do produto cristalizado que, neste caso, indicou os picos que caracterizam o cristal de Halita (NaCl). Apresenta-se como massas cristalinas granulares, as quais exibem clivagem cúbica, conhecida como sal-gema ou sal rocha sedimentar, típica de um grande número de compostos.

Uma cepa de *Aspergillus flavus* foi isolada durante um programa de seleção de microrganismo do solo para que se realizasse uma caracterização inicial de suas enzimas extracelulares [PERALTA, DOMINGUES, 1993]. Esse fungo pode estar presente em diversos meios, é facultativamente anaeróbico, ou seja, atua com ou sem a presença do gás oxigênio, além de ser filamentososo e resistir a uma ampla faixa de temperatura. Ademais, este fungo tem sido apontado como potencial de degradação dos hidrocarbonetos de petróleo com a atividade da produção microbiana [RAPER, FENNELL,1990].



Os fungos isolados e identificados na **Mistura Microbiológica** de campo foram do Reino *Fungi*, do Filo Ascomycota, dos Gêneros *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp e das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*. Houve também os contaminantes *Mucor* spp e *Paecilomyces* spp.

O processo tratado neste trabalho é empregado para obtenção de uma proteína com a molécula amida enzimática, que ao ser processada em cristais de halita com compostos metálicos reativos específicos, torna-se responsável por detectar mecanismos que viabilizem a produção de biossensores.

Utiliza-se no processo de biorremediação um consórcio de subprodutos da primeira geração de biocombustíveis – glicerina bruta e torta de mamona (*Ricinus communis*) – usados como bioestímulos e associados aos fungos com a proteína vegetal inibidora ricina da mamona no processo da fermentação alcoólica. No caso da biorremediação de áreas impactadas de manguezal, é utilizado o método de bioaumento dos microrganismos com a adição dos fungos supramencionados, dentre outros.

Para o processo de biorremediação no experimental de campo foi desenvolvido, primeiramente, na bancada do laboratório NEA– Núcleo de Estudos Ambientais do Instituto de Geociências- Geoquímica (IG/UFBA) – a semeadura dos fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp para serem repicados. Para isso foi feito uma mistura compreendendo 3,37%pp de torta de mamona com 12,82%pp de glicerina bruta de mamona, foi adicionado a petróleo parafínico, uma concentração em uma faixa de valores entre 13,25% p/p e 32,05% p/p de, e areia, em uma proporção de 38,46% p/p, posteriormente o agente fúngico. Conforme adaptação equivalente de Depósito de Patente UFBA, [QUINTELLA, GONÇALVES, 2010].

Com o objetivo de conhecer quais os elementos inorgânicos que estão contribuindo para o processo de volatilização na biorremediação foi previamente analisado o sedimento manguezal que compõe a mistura como referencial por Fluorescência de Raios-X.

A Mistura Microbiológica experimental apresenta a seguinte composição, expressa em porcentagem (%) com relação ao peso total:

- a) água de produção – solução salina obtida da indústria de petróleo, na faixa de 20 a 30%;
- b) glicerina bruta – porção de 10 a 15%;
- c) biomassa residual – torta de mamona (possuindo toxicidade, devido à presença de ricina, e aminoácido cisteína) na faixa de 1 a 5%;
- d) sedimento argiloso de manguezal contaminado – na faixa de 15 a 25% (contendo petróleo, compostos minerais, elementos inorgânicos e metais de transição alcalinos);
- e) areia calcinada - de 40 a 50%;

f) agente biológico – cepas do fungo *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp.

Já num segundo momento, foi preparada uma mistura microbiológica contendo a seguinte composição (w/w): 13,6% de petróleo, 13,2% de glicerina bruta, 3,4% de torta de mamona, 26,6% de areia calcinada, 17,6% de sedimento manguezal, 25,6% de água de produção e fungos.

O processo de obtenção de cristal protéico para biossensores, compreende as seguintes etapas:

- 1) aquecer a mistura microbiológica a uma temperatura na faixa entre 70 e 90°C, sob agitação, durante cerca de 3 minutos;
- 2) distribuir a mistura em placas de Petri com tampa;
- 3) semear o fungo *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, e deixar em repouso;
- 4) aguardar cerca de 90 a 150 dias para o aparecimento dos cristais;
- 5) e adicionar produto clorado para obter a formação da proteína amida.

### 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise prévia do sedimento de referencia por Fluorescência de Raios-X, obteve-se os elementos inorgânicos, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Elementos inorgânicos presentes em sedimento contaminado.

<b>Sedimento contaminado ref manguezal</b>	
<b>Elemento</b>	<b>Quantidade %</b>
Silício	2.306
Potássio	0.176
Ferro	0.171
Enxofre	0.155
titanio	0.05
Zircônio	0.006
vanádio	0.002
Manganês	0.001
Estrôncio	0.001
Cromo	0.001
Rubídio	0.001
Bromo	0.001
Zinco	0.001
Mercúrio	0.001
Ítrio	0
Orgânico CHO	97.126

Após um período de 90 dias de semeadura dos fungos, observou-se que ocorria, na parte superficial das amostras em placas de Petri, maior proliferação e aglomeração da

população fúngica, na qual se desenvolveram resíduos e produto cristalizado com brilho, incolor e transparente (Figura 02).

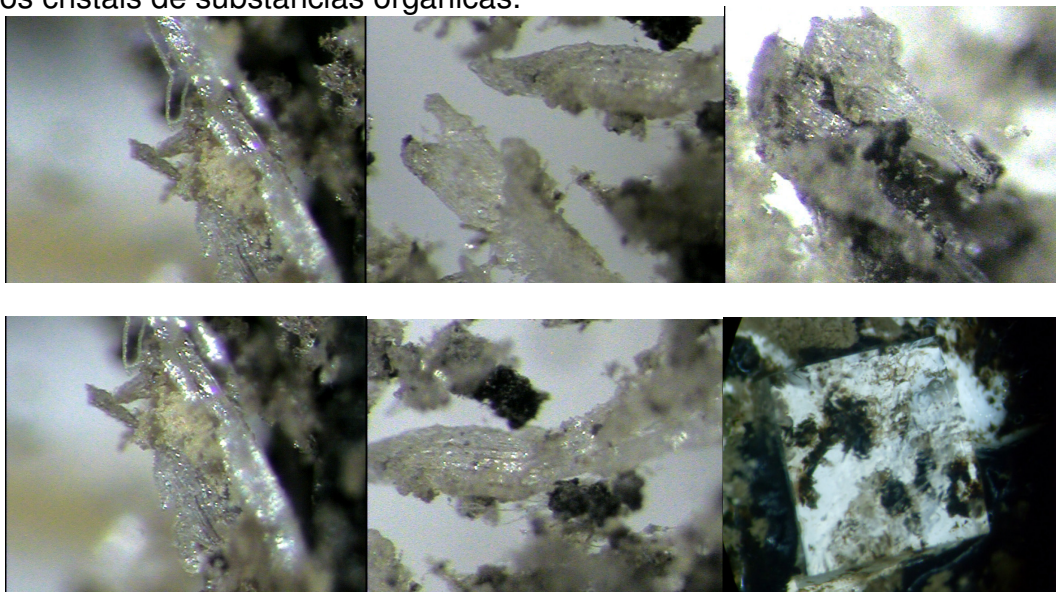
**Figura 2.** Filetes de cristais de Halita em Placa de Petri e imagem de Espectroscopia Eletrônica de 0,05 mm da mistura microbiológica



Os cristais foram produzidos a partir dos seus rejeitos, como esporos dos fungos. Estes foram sintetizados, gerando, em seguida, outros cristais de forma quadrada e retangular (Figura 3).

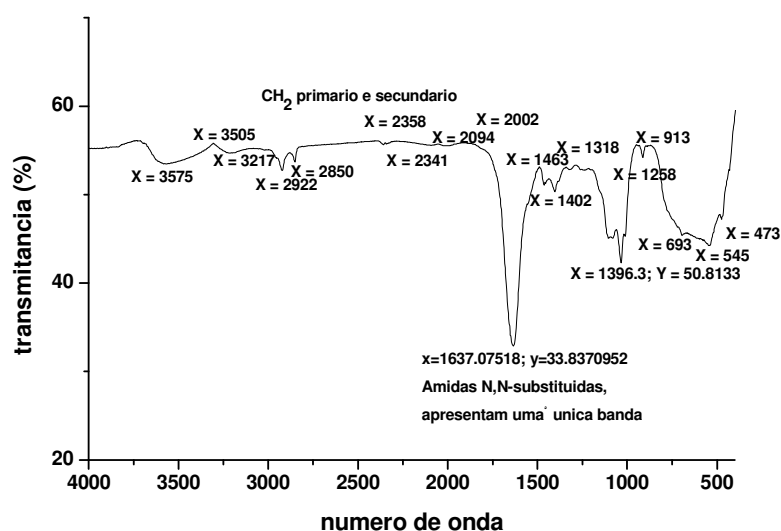
Com o objetivo de caracterizar tais produtos, foram realizadas análises de Fluorescência de Raios-X, Difractometria de Raios-X e Infravermelho (FTIR). Para a análise de Difractometria de Raios-X, foram retirados, especificamente, cada um dos cristais da amostra em aparelho de Lupa Eletrônica, e condicionados para posterior análise, em seguida foi macerado para serem analisados de forma homogênea.

**Figura 3.** Série de fotografias que mostram, através de microscópio eletrônico, os cristais de substâncias orgânicas.



Ao analisar o residual do produto microbiológico cristalizado em infravermelho, (Figura 4) obteve-se a origem orgânica do produto, destacando a banda de amidas em 1637.07518 N, N- substituídas que representam a estrutura secundária da proteína e os demais picos que envolvem o estudo. Os picos do infravermelho detectaram os metalóides halogenios reativos com propriedades enzimáticas, supostamente utilizados pelo aminoácido cisteína metalo-protease, em seu processo catalítico de transformação.

**Figura 4.** Espectro resultante da análise de infravermelho.



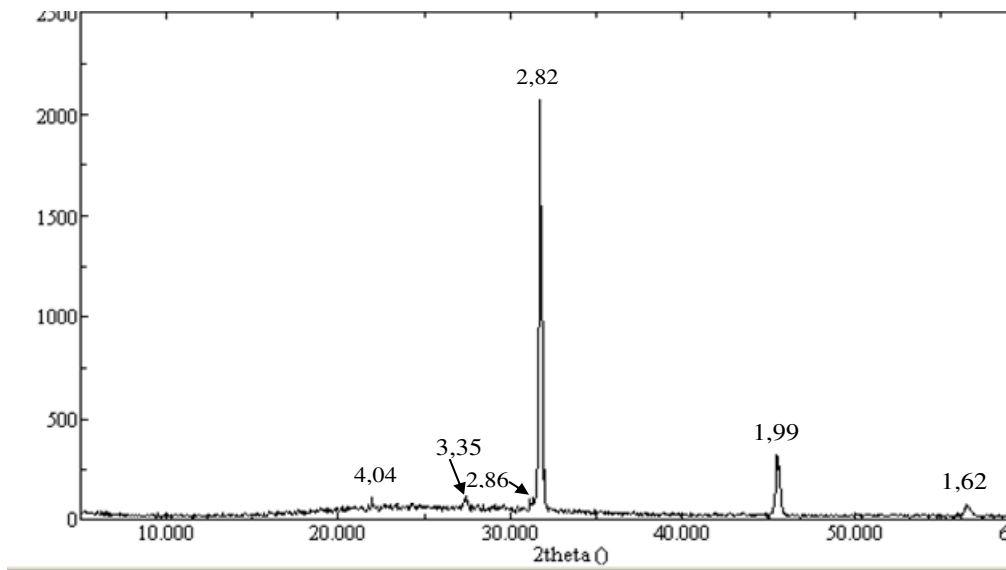
Levando em consideração o gráfico, pode-se identificar os picos que indicam:

- no comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) de 3.600 a 2.700, a absorção de átomos de C-H, O-H e N-H;
- nos picos de comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), de 1.700 a 1630, C=O de amidas, e de 1.670 a 1.630, Amidas N, N-substituídas, apresentando uma única banda;
- em 1.400 C-Halogenios, C-Cl, C-Br; em 1.311,  $\text{SO}_2$ ;
- em 1.347 C-O de ácidos carboxílicos; em 1.037 S=O sulfóxido e de 698 à 472 anel aromático, naftaleno e Halogênio C-Cl, C-Br.

Este resultado deve-se à ricina de mamona que contém a cisteína, elemento que hidroliza e desidrata o sedimento. Com o passar dos dias, o fungo prolifera adaptando seu metabolismo, orgânico e inorgânico, e, em consequência, o sedimento passa a ficar com o pH alterado.

Com análises por Difractometria de Raios-X identificou-se (Figuras 5) o mineral Halita. Os elementos inorgânicos reagem e produzem o sal de halita ( $\text{NaCl}$ ). Entretanto, agregam, em sua composição, outros compostos reativos minerais existentes no manguezal.

**Figura 5:** Difratomia de Raios-X indicando os picos que caracterizam o cristal Halita (NaCl), durante os primeiros 90 dias da sementeira

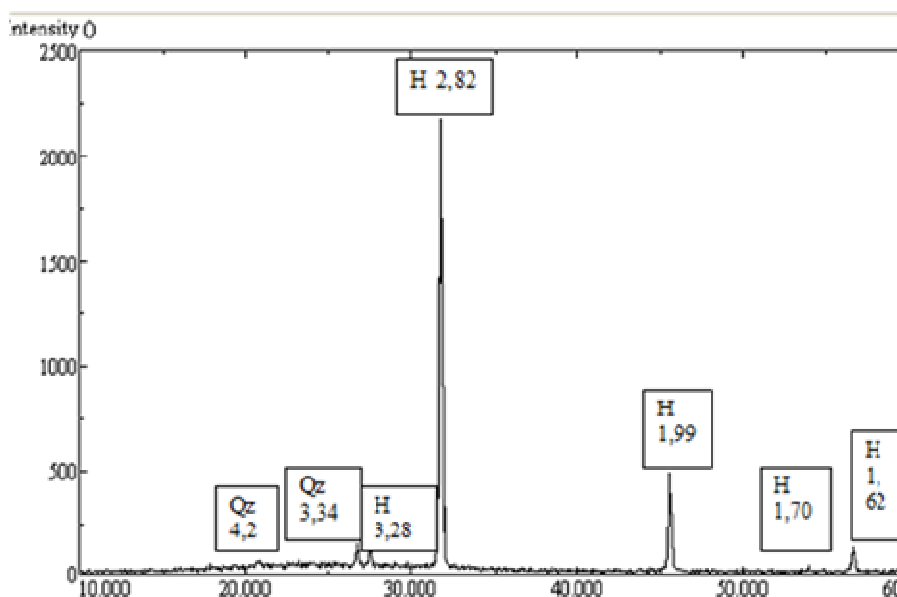


Fonte: Difratomia de Raios-X, GQ-UFBA

É importante destacar o fator tempo na validação com a comparação da sementeira 1 e sementeira 2, por Difratomia de Raios-X na qual após 90 dias, se observou maior quantidade de agregação dos metalóides (inorgânicos) aos cristais e nas estruturas cristalinas maior forma em tamanho (Figura 6). A caracterização do cristal Halita mostrou os picos 4.04 H; 3.35 H; 2.86 H; 2.82 H; 1.99 H; 1.62 H no tempo até 90 dias. Entretanto após este período verificou-se os picos 4.2 Qz e 3.34 Qz além dos outros já existentes. Portanto como principal Cristal de Halita e como secundária Sílica Cristalizada.

**Figura 6:** Difratomia de Raios-X após 90 dias da sementeira

CRISTAIS DE HALITA (+) SILICA CRISTALIZADA  
(principal) (secundário)



Fonte: Difratomia de Raios-X, GQ-UFBA

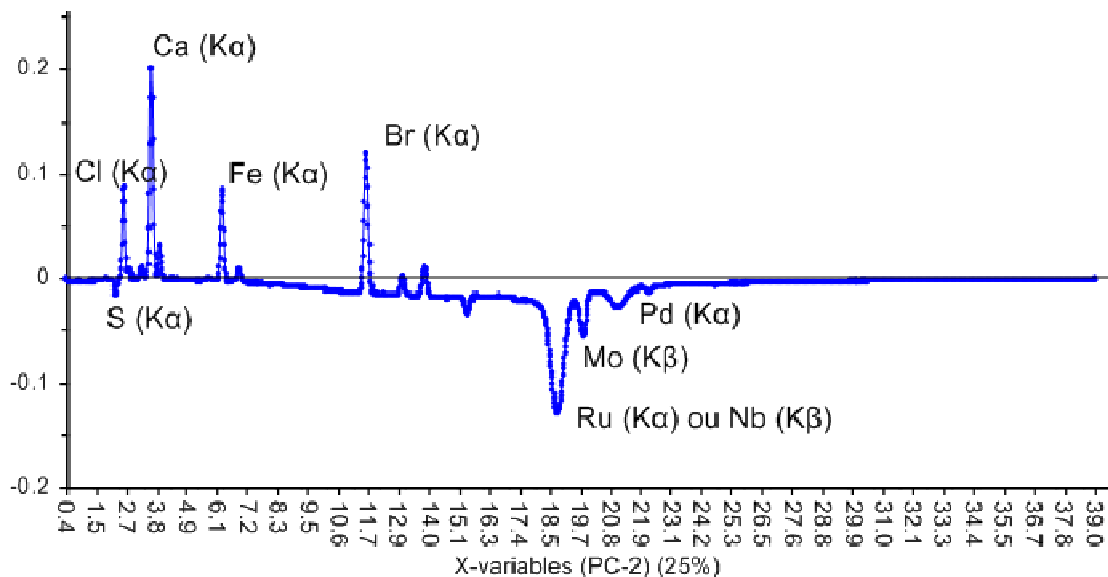
Em virtude disso, fez-se necessário, também, a análise do residual cristalizado por meio de Fluorescência de Raios-X, visando à investigação e à identificação dos possíveis elementos inorgânicos. O resultado da investigação é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Análise inorgânica em Fluorescência de Raios-X, até 90 dias.

<b>Cristal Protéico Fluorescência de Raios-X</b>	
<b>Elemento</b>	<b>Quantidade %</b>
Cl/Na	8.24%
Enxofre	0.22%
Ferro	0.14%
Potássio	0.11%
Cálcio	0.05%
Titânio	0.01%
Bromo	0.00%
Gálio	0.00%
Orgânico CH <sub>2</sub> O	91.24%

Pode-se observar que foi confirmada a presença de 91,238% de matéria orgânica nos cristais, e ainda, de elementos metálicos e não metálicos, como cloro, enxofre, ferro, potássio, cálcio, titânio, bromo e gálio, na primeira fase. Após a análise covariante de dados do tipo Componentes Principais (PCA), identificou, pelos scores e loadings, os elementos minerais que reagem e sofrem transformação no processo de biorremediação – enxofre, cloro e cálcio (Figura 7) – possivelmente reagem com ferro, cobalto e zircônio inicialmente. Já em uma segunda etapa, o gráfico mostra uma possível reação que ocorre com bromo, rutênio ou mobilidênio.

**Figura 7.** Novos grupos de minerais que estão contribuindo a biorremediação e formação dos cristais.



O aparecimento do produto transparente e com brilho sobre os cristais evidencia uma transformação significativa. Dessa forma, pode-se afirmar que o produto formado na placa sofreu volatilização, e formou um cristal protéico de amida proveniente dos aminoácidos da mistura microbiológica. Ao ser analisada por Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), esta foi identificada como amida, o que vem reafirmar que a partir de um processo geoquímico e microbiológico desenvolvido pode se chegar à produção de uma proteína, cuja formação se faz pela polimerização de aminoácidos.

Este resultado, também, torna-se importante quando se leva em conta que as amidas normalmente não ocorrem na natureza, sendo, muitas vezes, preparadas em laboratório. Comumente, são obtidas a partir da desidratação de sais de amônio por meio de aquecimento, sendo largamente utilizadas na indústria farmacêutica.

Outro resultado importante foi notado após a mistura microbiológica ter efetuado o processo de biorremediação, já que com a adição de produtos clorados, por exemplo, o diclorometano, ocorreu reação com 100% de cristalização.

O produto biológico obtido possui a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito. Neste caso, a interação resulta da alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas, tais como modificação do pH, transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons, que podem ser detectados e medidos por um transdutor. Em outras palavras, isto significa que um determinado analito ou grupo de analitos interagem com o elemento biossensível, produzindo um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração do referido analito.

Ademais, foram realizados testes com alguns analitos específicos, os quais são aqui mencionados a título de ilustração e exemplo. Ainda, ficou comprovada a reatividade a cloro, potássio, bromo (Tabela 1), diclorometano, entre outros. De outro lado, devido à reatividade do bromo, demonstrou ser volátil e denso, reagindo vigorosamente com aminas, alcenos, fenóis e hidrocarbonetos, estando seco no cristal, além de reagir vigorosamente com titânio e metais alcalinos, sódio e potássio (brometo de potássio).

Importante apontar que, conforme descrito na literatura, a reatividade neurotóxica do gás cloro na formação de sais por meio de processo de oxidação, por exemplo, pode ser comprovada com células fotoelétricas. Os experimentos mostraram reatividade do cloreto de sódio em 8%. Por outro lado, a ligação proteica de ferro/enxofre (Fe/S-C) pode ser comprovada pela transferência de elétrons.

Esse consórcio visa atender aos desafios tecnológicos ambientais, uma vez que a

glicerina bruta e a torta de mamona são renováveis e, juntamente com fungos anaeróbicos facultativos, elaboram uma fermentação no sedimento argiloso do manguezal. Destaca-se, ainda, que o bioestímulo natural, a *Ricinus communis*, é um agente transformador que contribui para o processo de hidrólise na formação de resíduos cristalizados e na captura das substâncias ciclisadas e gasosas, ao mesmo tempo em que promove a biorremediação dos contaminantes.

## 6. 5. CONCLUSÃO

Os resultados alcançados durante a realização deste trabalho permitem-nos concluir que o produto obtido possui uma enzima (Amida) com características eletromagnéticas, (com os elementos Cloro, Enxofre, Ferro, Potássio, Cálcio, Titânio, Bromo, Gálio) capazes de produzir um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração de determinados elementos químicos (analito ou grupo de analitos) presentes em uma amostra, os quais interagem com o elemento biossensível, tornando possível sua identificação por um transdutor.

As características descritas acima abrem um leque de possibilidades de aplicação do biossensor obtido, em diferentes áreas tecnológicas, uma vez que o produto pode ser empregado como catalizador pela eletrólise com célula de membrana, como exemplo não restritivo o cloreto-ferroso ( $\text{FeCl}_2$ ). Ainda, pela incorporação de rutenio na proteína, pode ser usado na indústria eletrônica, em contatos elétricos e em resistências para chips, sendo também bastante requisitado na indústria química, nomeadamente para a produção de eletrodos e catalisadores. Já na área médica, o cálcio enzimático proporciona atividade nas membranas celulares, dando impulso nervoso celular. Na área industrial, por seu turno, o samário-cobalto,  $\text{SmCo}_5$ , é usado para a produção de ímãs permanentes com resistência à desmagnetização.

## REFERÊNCIAS

BETTELHEIM, F.A.; LANDESBURG, J.M. *Introduction to general, organic and biochemistry*. 5nd ed., Belmont, International Thomson, 1999.

CERNIGLIA, C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 19, p. 324-333, 1997.

CUNHA, G.R. Propriedades Reológicas de Exopolissacarídeos produzidos por Bactérias dos Generos *Rhizobium* E *Mesorhizobium*, **Semina: revista cultural e científica da**



Universidade Estadual de Londrina, v. 20-21, p. 68, 2008.

MARIANO, A.P., **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel** [s.n.], p. 162 f., 2006.

MELO, A.F.; SALGADO, A.M.; PINTO, G.A.S., Estudo preliminar de um biossensor enzimático para taninos hidrolisáveis. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 21. **Anais...** Belo Horizonte, 2008.

NITSCHKE M., PASTORE G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Quím. Nova*, Campinas, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

PERALTA R.M.; DOMINGUES C.M. Production of amylase by soil fungi and partial biochemical characterization of amylase of a selected strain (*Aspergillus fumigatus*). *Can. J. Microbiol.*, v. 39, p. 681-685, 1993.

PITT J.I., *A laboratory guide to common Penicillium species*. Austrália: CSIRO, 1985.

QUINTELLA C.M.; TEIXEIRA L.S.G.; KORN M.G.A.; COSTA NETO P.R.; TORRES E.A.; CASTRO M.P.; JESUS C.A.C. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. *Quím. Nova*, v. 32(3), p. 793-808, 2009.

RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. *The genus Aspergillus*. The Williams & Wiks CO: Baltimore, 1999.

RODWELL V.W., CATABOLISM OF PROTEINS OF AMINO ACID NITROGEN. IN: MURRAY R.K., MAYES, P.A., RODWELL V.W. GRANNER D.K. (Eds.), *Harper's Biochemistry*. 25nd ed., McGraw-Hill/Appleton & Lange, NY, USA, p. 313-322, 1999.

SALGADO, A.M.; FOLLY, R.OM.; VALDMAN, B. Biomass monitoring by use of a continuous on-line optical senso. **Sensors & Actuators B: Chemical** , v.75, n.1-2, p. 24-28, 2001.

Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química. Cristina M. Quintella; Odete Gonçalves. **Processo de obtenção de produto biodegradável para aplicação na remediação de solos, águas e ambientes impactados e método de funcionamento**. PI BR n. 1004444-2 A2, 2010.

UÑA, G.V.; GARCÍA, M.J.N. Biodegradation of non-ionic dispersants in sea water, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 18, p. 315-319, 1983.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

Para a pesquisa aqui efetuada, conclui-se que a Mistura Microbiológica foi eficiente para a biorremediação (*artigo 1*) de manguezais contaminados com petróleo.

Reforçando esta avaliação, aponta-se que o bioestímulo, torta de mamona, dentre os avaliados, mostrou-se mais eficiente porque resultou em dois produtos ou novos materiais: 1) película polimérica (*artigo 2*), aqui identificada como biopolímero; 2) cristal protéico (*artigo 3*) a ser futuramente caracterizado em sua estrutura e fase cristalógraficas.

Conclui-se que, o fungo *Aspergillus* com mamona obteve melhor biorremediação, isto é foi detectado menor quantidade de hidrocarboneto comparando-se com o *Penicillium*.

Conclui-se que, compararam-se os bioestimulantes, o *Aspergillus* com NPK mostrou-se mais eficiente do que o *Penicillium* e NPK. Entretanto se considera que o NPK não foi um agente biorremediador seguro na sua concentração aplicada, devido ao grande aumento da população microbiana.

Em termos de bioaugmentação define-se o fungo *Aspergillus* spp (*flavus*) como agente biorremediador, conforme dados cromatográficos, a ser posteriormente publicado.

A contribuição dos derivados da mamona (glicerina bruta e torta de mamona) é avaliada como mais eficiente em relação ao fertilizante NPK como bioestimulos, pois esse contém a metalo-protease cisteína (*artigo 2*) que permite a ligação enxofre e modifica a atividade enzimática e a soimobilização dos nutrientes dos fungos para o desenvolvimento e proliferação fúngica avaliados através de análises de cromatografia (*artigo 2*);

Conclue-se que houve aumento do ph e a diminuição do Eh, criando condições redutivas, nos gráficos de salinidade e Eh (Mv), observou-se que a cada duas semanas tem um pico de Eh (Mv) mais baixo.

Foi analisado a quantidade de HTP/Kg, durante 8 semanas e se conclui que o fungo *Aspergillus* com mamona e NPK possui menor concentração até 500 HTP ppm (mg HTP Kg óleo) e *Penicillium* com mamona e NPK, até 800 HTP ppm (mg HTP Kg óleo), durante 8 semanas. Houve um aumento de alcanos de cadeia aberta no pico C14, este pode se atribuir a elevada concentração de compostos NOS (nitrogênio, oxigênio e enxofre) oriundos da mamona, existente na mistura não resolvida (MCNR) que contribuem para o processo de biorremediação ao ser permeado e reduzido. Para os fungos *Aspergillus* e *Penicillium* com mamona em torno de 50.000 ppm de concentração de MCNR, e para *Penicillium* com NPK obteve maior MCNR em até 60.000 ppm, equivalente a menor biorremediação.

De acordo com o cromatograma de *Aspergillus*, 60 dias, houve uma elevação na Figura a qual permite sugerir que houve biorremediação, possivelmente dos hidrocarbonetos aromáticos.

Verificou-se que o hidrocarboneto pristano obteve um maior índice de biorremediação na simulação *Penicillium* e mamona, sendo que na 8ª semana se mostrou mais eficiente com concentração de 7.2 ppm.

Os compostos orgânicos foram avaliados com a bioestimulação dos fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, comprovando a degradação de óleo no ambiente estudado conforme dados de cromatografia. Estes foram acompanhados por XRF para inorgânicos, o que indicou os metalóides que estão contribuindo para a transformação bioquímica. Esses dados serão objetos de publicações futuras.

Mas especificamente como resultado em **XRF**, pode-se confirmar que os filamentos cristalizados são compostos por 91% de matéria orgânica, seguido dos compostos metálicos e não-metálicos inseridos nos residuais que acompanham os cristais.

**Em Difractometria de Raios-X** indicando os picos que caracterizam o cristal Halita (NaCl). Este resultado deve-se à ricina de mamona que contém a cisteína, elemento que hidroliza e desidrata o sedimento.

Conclui-se que o fator tempo é um diferencial na validação para a comparação da semeadura 1 e semeadura 2, por Difractometria de Raios-X na qual após 90 dias, se observou maior quantidade de agregação dos metalóides (inorgânicos) aos cristais e nas estruturas cristalinas maior forma em tamanho. Entretanto após este período verificou-se os picos 4.2 Qz e 3.34 Qz, além dos outros já existentes. Portanto como principal Cristal de Halita, e como secundária Sílica Cristalizada.

Ao analisar o residual de produto microbiológico cristalizado em **Infravermelho**, obteve-se a origem orgânica do produto, destacando a banda de amidas em 1637.075 N, N-substituídas que representam a estrutura secundária da proteína e os demais picos que envolvem o estudo.

A mesma análise de Infravermelho foi efetuada com os biopolímeros concluindo-se como resultado os mesmos compostos orgânicos dos grupos funcionais que se obteve com o cristal proteico. Porém, a transmitância do biopolímero se efetiva de 0 a 40%, enquanto que a transmitância, fração de energia luminosa, incidente do comprimento de onda do cristal se efetiva acima de 30 a 60 %. Assim sendo, verificamos que se trata da mesma enzima protéica, atuando em reações de transformações de diferentes tempos, locais, estado físico e, finalmente, na produção de produtos.

Ainda em **Fluorescência de Raios-X**, o biopolímero, pela ação dos fungos *Aspergillus* spp com a proteína vegetal *Ricinus communis* foram obtidos 99.8 % de material orgânico e somente 0.2 % de minerais, resultado este que nos permite opinar que este biopolímero orgânico, é mais purificado, sem residual (silício) com elasticidade e sintetização em abundância. Na análise do biopolímero formado pelo fungo *Penicillium* com a proteína ricina, por seu turno, verificou que 98.88% são constituídas de matéria orgânica e 1.12 % é constituída de minerais e resíduos.

**Análise Covariante de Dados – PCA** – Dados de Fluorescência de Raio X, mostrando os principais elementos inorgânicos que contém a mistura biológica. Resultando-se na transformação nos elementos inorgânicos após 8 semanas de biorremediação bioquímica. Observa-se que PC-1 em 58% os grupos de mineralóides enxofre, cloro e cálcio em negativo, alfa, reagindo com ferro, cobalto e zircônio.

Registra-se que foram produzidos dois rejeitos resultantes do processo de biorremediação. Esses produtos foram investigados, sendo seu processo e produto feito deposita de transferência de tecnologia, Patente Tecnológica PI UFBA/2011 para a biomassa que se convencionou como biopolímero amida “POLIAMIDA”. Outro importante subproduto foi o cristal protéico de Amida, que gerou a PI UFBA/2011 com substancias reativas características para emprego da área biomédica, biotecnológica e eletrônica capaz de produzir biossensores.

Conclui-se ainda ao afirmar que foram feitos análise toxicológica para aflatoxina com resultados negativos.

**Como considerações finais e perspectivas futuras** são projetadas um estudo de purificação do biopolímero, para emprego na indústria de materiais. Identifica-se um bom potencial para o desenvolvimento de um compósito de tecido reforçado, a partir de Biopolímero Protéico composto de Amida (FUNAMIDA) produzido pela digestão de petróleo exsudado por fungos e mamona.

O Biopolímero sintetizado poderá ser futuramente estudado como alternativa aos polímeros atuais, em edital apropriado, para contribuir com a redução da dependência de polímeros derivados de petróleo da cadeia produtiva de bens de consumo. Pode-se citar como exemplo a atual crise de desabastecimento de PA12 (HPAs) (polímero), importante para a indústria automobilística.

Pretende-se também encaminhar para área de estudos medicinais na criação de fármacos em projeto doutorado/UFBA os cristais protéicos de Amida como um antimicrobiano. Outro objeto de futura investigação cita-se a investigação de como se apresentam os cristais protéicos em sua solidificação (fases e estruturas cristalográficas) e textura.

Com o bom rendimento e satisfação dos resultados adquiridos quando da aplicação do experimental de bancada para aplicação em aquário/tanque de laboratório de campo e, afim de aumentar a produção dos produtos do processo de biorremediação, foi projetada a montagem de um protótipo de Estação de Tratamento com aplicação da Mistura Microbiológica aqui estudada. O protótipo refere-se a uma estação subterrânea ou plataforma marítima composta de um tanque na superfície e três tanques introduzidos no seu interior hermeticamente fechado. O tanque de superfície recebe petróleo derramado, rejeito petroquímico, borra oleosa de esgoto, neste é feito a adição dos componentes de uma mistura microbiológica de tratamento. Dessa forma pode-se armazenar as coletas dos sobrenadantes película biopolímero, como também coletar através de uma tela suspensa os cristais protéicos sintetizados pela hidrólise e volatilização das substancias.

Depósito de Patente de Invenção (3) (PI) (Apêndice J) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Instituto de Geociências. Cristina Maria Quintella; Odete Gonçalves; Patente de Invenção BR; **ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGOTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO;** (em sigilo), 2012.

## REFERÊNCIAS

AGRONOMIA - **Guia do estudante**. Disponível em: <guiadoestudante.abril.com.br>. Acesso em: 10 dez. 2011.

ANTROPOLOGIA E NUTRIÇÃO: **um diálogo possível** – BVS. Ministério da Saúde. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd10\_01.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2011.

ALVARENGA, R. S.; SCHERER, C. M. S.; KUCHLE, J. Integração de dados de sensoriamento remoto e sísmica 3D na análise estrutural na Bacia do Recôncavo - Bahia. In: **PDPETRO**, 4. Campinas: UNICAMP, 2007, p. 1-7.

ALVAREZ-SANCHEZ, M. E. A. *et al.* A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. **Microbial pathogenesis**, v. 28, p. 193-202, 2000.

ATLAS, R. M. Bioremediation. **Chemical & Engineering News**, EUA, v. 73, p. 32-42, 1995a.

ATLAS, R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 178-1821, 1995b.

BARBOSA, D. B. **A noção de originalidade e os títulos de obra, em particular, de software**, 2005. Disponível em: < <http://denisbarbosa.addr.com/originalidade.pdf> >. Acesso em: 20 dez. 2011.

BELTRÃO, N. E. M. Informações sobre o Biodiesel, em especial feito com o óleo de mamona. (Em pauta- **Comunicado técnico da Embrapa**), Brasília, n. 177, 2003.

BELTRÃO, N. E. M. Torta de mamona (*Ricinus communis* L.): fertilizante e alimento. **Comunicado técnico** n. 171 da Embrapa, jan. 2003. ISSN 0102-0099.

BETTELHEIM, F. A.; LANDESBURG J.M. **Introduction to general, organic and biochemistry**. 5nd ed. Belmont: International Thomson, 1999.

BEYNOM, R.J.; BOND, J.S. **Proteolytic enzymes: A practical approach**. Oxford: Academic press, 1989.

BEUREN, I. M. Como elaborar trabalhos monográficos em contabilidade: teoria e prática. São Paulo: Atlas, 2006.

BOCK, A. M. B. *et al.* **Psicologias: uma introdução ao estudo da psicologia**. 13 ed. São Paulo: Saraiva, 2001.

BONAVENTURA, C.; JOHNSON, F. M. Healthy environments for healthy people: Bioremediation today and tomorrow. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 5-20, 1997.

BORGES, S. M. S.; LIMA, A. M. V.; MUSSE, A. P. S.; ALMEIDA, P. M. M.; QUINTELLA, C. M. Recuperação secundária de óleo pesado e completação de reservatórios de campos maduros utilizando o subproduto (glicerina bruta) da produção do biodiesel.

**Boletim técnico da Produção de Petróleo**, n. 2, p. 131-152, 2007. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/coproducto/19.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2011.

BORGES, S. M. S. *et al.* **Recuperação avançada de petróleo parafínico com a injeção de glicerina bruta (GB) co-produto da produção de Biodiesel**. 2007. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/coproducto/19.pdf>>. Acesso em: 25 mai. 2011.

BRASIL. Lei n.º 10.973 de 2 de dezembro de 2004. **Dispõe sobre incentivos à inovação e a pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo e dá outras providências**. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2004/lei/110.973.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/lei/110.973.htm)>. Acesso em: 15 dez. 2011.

BRASIL. Decreto-lei nº 7.903, de 27 de agosto de 1945. **Código de Propriedade Industrial**. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/1937-1946/Del7903.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/1937-1946/Del7903.htm)>. Acesso em: 15 dez. 2011.

BREMNER, J. M. Total Nitrogen. Methods of soil analysis Part 2 - Chemical and Microbiological Properties. Series Agronomy, 9. **American Society of Agronomy**, Inc. Publisher, USA, 1965. p. 1149-1178.

CARVALHO, C. N. Geoquímica ambiental - conceitos, métodos e aplicações. **Geochimica Brasiliensis**. v. 3, n. 1, p. 17-22, 1989.

CASSIDY, D. P.; HUDAK, A. J. Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 84, p. 253-264, 2001.

CAVALCANTI, F.J.A. **Fertilizer recommendations for the State of Pernambuco: 2nd approach**. Pernambuco Agricultural Research Company, 1998.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 324-333, 1997.

CETESB. Projeto CETESB - GTZ. **Investigação para Remediação 10000**. 2010. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/areas\\_contaminadas/Capitulo\\_X.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/areas_contaminadas/Capitulo_X.pdf)>. Acesso em: 23 abr. 2011.

CLÉCIO, E. **Conceito sobre fungos**. 07 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.jornallivre.com.br/87590/conceito-sobre-fungos.html>>. Acesso em: 14 jan. 2011.

CONTABILIZAÇÃO de ganhos em projetos de melhorias. Disponível em: <[br.kaizen.com/.../contabilizacao-de-ganhos-em-projetos-de-melhorias](http://br.kaizen.com/.../contabilizacao-de-ganhos-em-projetos-de-melhorias)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

BRASIL. Decreto-lei nº 5563, 11 out. 2005. **Convenção de Paris para a proteção da propriedade industrial** – 1967. Decreto nº 5563. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/.../D5563.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/.../D5563.htm)>. Acesso em: 12 dez. 2011.

CRAPEZ, M. A. C. *et al.* Biorremediação para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 179, p. 32-37, jan./fev. 2002.

CUNHA, G.R. Propriedades Reológicas de Exopolissacarídeos produzidos por Bactérias dos Generos *Rhizobium* E *Mesorhizobium*, **Semina: revista cultural e científica da Universidade Estadual de Londrina**, v. 20-21, p. 68, 2008.

CYSTINOSIS. DBpedia. Disponível em:<<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/22/Cystine-skeletal.png>>. Acesso em: 14 fev. 2011.

DAL BOSCO, S. M.; JIMENEZ, R. S.; CARVALHO, W. A. **Aplicação da zeólita natural escolecita na remoção de metais pesados de efluentes industriais: competição entre os cátions e processo de dessorção**. Eclét. Quím, São Paulo. v. 29, n. 1, p. 47-56, 2004.

DIAS, M.V.B.; ELY, F.; CANDURI, F.; PEREIRA, J.H.; FRAZZON, J.; BASSO, L.A.; PALMA, M.S.; DE AZEVEDO, W.F.; SANTOS, D.S. **Acta Crystallogr. Sect. D.-Biol. Crystallogr.** v. 60, p. 2003-2005, 2004.

DOMINGUEZ, J.M.L.; MARTIN, L.; BITTENCOURT, A.C.S.P.; LEÃO, Z.M.A.N. - Capítulo VII - Geologia do Quaternário Costeiro e Plataforma Continental. In: Projeto Costa do Descobrimento - Avaliação da Potencialidade Mineral e Subsídios Ambientais para o Desenvolvimento Sustentável dos Municípios de Belmonte. Santa Cruz Cabrália, Porto Seguro e Prado, ed. 1, Salvador: Companhia Baiana de Pesquisa Mineral, 2000.

Empresa pernambucana de pesquisa agropecuária. **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: 2ª aproximação**. Recife: EPPA, 1998.

FAVERO, J. G. T. **Técnica de adição de composto para bioaugmentação, biorremediação, bioproteção e bionibição**. BR n. PI0502451-0 A2, 23 jun. 2005.

FÁVERO, K.B.; FENNELL, D.I. **The genus Aspergillus**. Baltimore, USA: The Williams Wiks CO., 1999.

FUNGOS. Disponível em:< [http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_pos2003/const\\_microorg/fungos.htm](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/fungos.htm)>. Acesso em: 14 fev. 2011.

GERENCIAMENTO DE RISCOS CORPORATIVOS - Estrutura Integrada. Disponível em: <[www.coso.org/.../COSO\\_ERM\\_ExecutiveSummary\\_Portuguese.pdf](http://www.coso.org/.../COSO_ERM_ExecutiveSummary_Portuguese.pdf)>Formato do arquivo: PDF/Adobe Acrobat>. Acesso em: 14 dez. 2011.

GESTÃO DO CONHECIMENTO. Disponível em: <[www1.serpro.gov.br/publicações/gco\\_site/m\\_capitulo01.htm](http://www1.serpro.gov.br/publicações/gco_site/m_capitulo01.htm)>. Acesso em: 14 dez. 2011.

GIL, Antonio Carlos. **Como elaborar projeto de pesquisa**. 3.ed. São Paulo: Atlas, 1999.



GLOSSÁRIO - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). Disponível em:  
<[www.cgee.org.br/prospeccao/index.php?operacao...tto...](http://www.cgee.org.br/prospeccao/index.php?operacao...tto...)>. Acesso em: 14 dez. 2011.

GLOSSÁRIO - Propriedade Intelectual. Disponível em:

<[www.propintelectual.com.br/site/index.php?option=com.Q](http://www.propintelectual.com.br/site/index.php?option=com.Q)>. Acesso em: 14 dez. 2011.

GLOSSÁRIO. Disponível: <[www.patentnet.com.br/glossario.htm](http://www.patentnet.com.br/glossario.htm)>. Acesso em: 14 dez. 2011.

GLOSSARY OF INNOVATION TERMS ARRANGED BY GERMAN EXPERTS.

Disponível em: <[http://194.245.126.39/doc/WP1\\_Glossar\\_German\\_Experts\\_1839.pdf](http://194.245.126.39/doc/WP1_Glossar_German_Experts_1839.pdf)>. Acesso em: 14 dez. 2011.

GRUSE, W. A.; STEVES, D. R. **Chemical technology of petroleum**, New York, London, McGraw-Hill book company, inc. 1942, 1960.

GUIOT, S. R.; TARTAKOVSKY, B. **Método de biorremediação síncrona contínua de um líquido contaminado e aparato para a biorremediação simultânea contínua de um líquido contaminado aquoso**. BR n. PI0510923-0, 25 maio 2005, 13 nov. 2007.

HUESEMANN, M.H. Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils. **Journal of Soil Contamination**, v. 3, n.3, p. 229-318, 1994.

INCUBADORAS DE EMPRESAS — SEBRAE. Disponível em:<[www.sebrae.com.br/customizado/inovacao/.../incubadora-de-empresa..](http://www.sebrae.com.br/customizado/inovacao/.../incubadora-de-empresa..)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. Disponível

em:<[www.tecpar.br/appi/Intermediario.../Parte%203\\_7%20-busca1.pd](http://www.tecpar.br/appi/Intermediario.../Parte%203_7%20-busca1.pd)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

INOVAÇÃO DE A A Z – TerraForum. Disponível em:

<[inove.terraforum.com.br/Paginas/inovacao.aspx?LID=I](http://inove.terraforum.com.br/Paginas/inovacao.aspx?LID=I)>. Acesso em: 10 dez. 2011

LACAZ, C. S. L. *et al.* **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEITE, S. G. F. *et al.* **Biorreator horizontal e processo de biorremediação de solos argilosos utilizando dito biorreator**. BR n. PI0502090-5, 09 jun. 2005.

LOBATO, A. K. C. L. **Estudo cinético da síntese de biossurfactantes**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal 2000.

MANUAL DE OSLO. Disponível em:

<[http://www.conacyt.gob.sv/Indicadores%20Sector%20Academcio/Manual\\_de\\_Oslo%2005.pdf](http://www.conacyt.gob.sv/Indicadores%20Sector%20Academcio/Manual_de_Oslo%2005.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

MANCERA-LÓPEZ, M. E.; ESPARZA-GARCIA, F. F.; CHÁVEZ-GÓMEZ, B.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; BARRERA-CORTÉS, J..

Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, p. 151-160, 2008.

MARIANO, A. P.; *et al.* Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 346-353, 2007.

MARTINS, V.G; KALIL, S.J; COSTA, J.A.V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v.31, n.8, p. 1942-1947, 2008.

ALVAREZ-SÁNCHEZA, L. M. E.; AVILA-GONZÁLEZA, C.; BECERRIL-GARCÍA A, L. V. FATTEL-FACENDAB, J. ORTEGA-LÓPEZC, R. ARROYO. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. **Microbial pathogenesis**, v. 28, p. 193-202, 2000.

MELO, A. F.; SALGADO, A. M.; PINTO, G. A. S. Estudo preliminar de um biossensor enzimático para taninos hidrolisáveis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 21., 2008, Belo Horizonte: SBCTA, 2008. **Biblioteca(s): CNPAT (PL SP 04439 UPC)**

MELO, H. S.; LEITÃO, L. C. (org). **Dicionário Tecnologia e Inovação**. Fortaleza: SEBRAE, 2010.

MORAES, I. C. *et al.* Influência do grau de hidrólise do poli(vinil álcool) nas propriedades físicas de filmes à base de blendas de gelatina e poli(vinil álcool) plastificados com glicerol. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 738-745, jul./set. 2008.

MULLIN, J. W. **Otimização da unidade de cristalização do clorato de sódio** **Crystallization**. 4 nd. ed. Butterworths: University of London, 1961.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quím. Nova**, Campinas, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, F. A. S. Microesferas de Quitosana com esporos de *Bacillus Subtilis* Lami007 não patogênicos imobilizados para uso na biodegradação de hidrocarbonetos, biofertilização, biotratamento de efluentes industriais e domésticos, e produção de biossurfactantes. BR n. PI0701873-8, 23 jul. 2007.

PEDROTI, G. I. **Ensaios de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

PERALTA R. M.; DOMINGUES, C. M. Production of amylase by soil fungi and partial biochemical characterization of amylase of a selected strain (*Aspergillus fumigatus*). **Can. J. Microbiol**, v. 39, p. 681-685, 1993.

PITT J. I. **A laboratory guide to common Penicillium species**. Austrália: CSIRO, 1985.

PONTE, V. M. R. *et al.* Análise das metodologias e técnicas de pesquisas adotadas nos estudos brasileiros sobre *balanced scorecard*: um estudo dos artigos publicados no período de 1999 a 2006. **Anais do I Congresso ANPCONT: a pesquisa na evolução das ciências contábeis**, n. 1. 2007, Gramado. , 17 a 19 jun. 2007. Disponível em: < [www.anpcont.com.br/site/docs/congressoI/03/EPC079.pdf](http://www.anpcont.com.br/site/docs/congressoI/03/EPC079.pdf)>. Acesso em: 02 dez. 2010.

PRADHAN, S.P. *et al.* Potential of Phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. **Journal of Soil Contamination**. Boca Raton, v. 7, n. 4, p. 467-480, 1998.

PUJOL, E. J. Redução Química *In situ* (ISCR). Inovação tecnológica para remediação de áreas contaminadas. **Revista Meio Ambiente Industrial**. jan. 2009.

QUINTELLA, C. M. *et al.* Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Quím. Nova**, Campinas, v. 32, n. 3, p. 793-808, 2009.

RAMOS, M. A. G. **Estudo da biorremediação do Herbicida Velpar K® In Vitro em meio aquoso com o uso do inoculante microbiano em-4 (Microrganismos Eficazes)**. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore:The Williams & Wiks CO:, 1990.

RIBEIRO, M. P. **Aplicação de termogravimetria acoplada à espectrometria de massas para caracterização de petróleo e determinação da curva de evolução de gás sulfídrico**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Petróleo) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

RODWELL, V. W. Catabolism of Proteins & Amino Acid Nitrogen. **Biomedical Importance**, Japão, n. 28, 2009.

ROQUES, D. E.; OVERTON, E. B.; HENCY, C. B. Using gas chromatography/mass spectroscopy fingerprint analyses to document process and progress of oil degradation. **Journal Environment Quality**, v. 23, n. 1, p. 851-855, 1994.

ROSA, A.P.; TRIGUIS, J.A. Estudos experimentais da análise do processo de biorremediação na mitigação do impacto ambiental. **Geochemica Brasiliensis**, v. 20, n. 1, p. 5-13, 2006.

SALGADO A.M.; FOLLY R.OM.; VALDMAN B. Biomass monitoring by use of a continuous on-line optical senso, **Sensors Actuators B: Chemical** , v.75, n. 1-2, p. 24-28, 2001.

SANTAELLA, S. T. *et al.* Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. **Eng Sanit Ambient**, v. 14, n.1, p. 139-148, jan./mar. 2009.

SANTOS, M. E. R.; TOLEDO, P. T. M.; LOTUFO, R. A. (orgs.). **Transferência de tecnologia: estratégias para a estruturação e gestão de núcleos de inovação tecnológica**. Campinas-SP: Komedi, 2009.

SERVIÇO SOCIAL & REALIDADE. Disponível em:

<[www.franca.unesp.br/ssrealidade/SSR\\_12N1.pdf](http://www.franca.unesp.br/ssrealidade/SSR_12N1.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2011.

SICE - **Dicionário de Termos de Comércio**: subsídios, antidumping. Disponível em:

<[www.sice.oas.org/dictionary/SACD\\_p.aspR](http://www.sice.oas.org/dictionary/SACD_p.aspR)>. Acesso em: 11 dez. 2011.

SISTEMA DE MADRI. **Publicação OMPI N° 418 (P)**. Disponível em:

<[http://www.wipo.int/freepublications/pt/marks/418/wipo\\_pub\\_418.pdf](http://www.wipo.int/freepublications/pt/marks/418/wipo_pub_418.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2011.

SOUZA, E. S. **Desenvolvimento de métodos de biorremediação aplicados a derrames de petróleo em água do mar – Testes laboratoriais**. 2003. 294 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Reservatório e Exploração de Petróleo) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé.

TAKAYA, N. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 506-510, 2002.

UÑA, G. V.; GARCÍA, M. J. N. Biodegradation of non-ionic dispersants in sea water. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 18, n. 5, p. 315-319, 1983.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP). Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments. **Reference methods for marine pollution studies**, n. 20, 1991.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Revista eletrônica do Departamento de Química**. A Química do Cabelo, Florianópolis. Disponível em:<<http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/cabelo.html>>. Acesso em: 14 fev. 2011.

UFBA. Instituto de Química (Salvador). Cristina Quintella; Odete Gonçalves. **Processo microbiológico para captura de voláteis e produção de biopolímero proteico**. Patente de Invenção BR UFBA, 21 out. 2011, em sigilo.

UFBA. Instituto de Química (Salvador). Cristina Quintella; Odete Gonçalves; Jorge Alberto Triguis. **Processo para obtenção de biossensores e biossensores**. BR n. Patente 221109478199, 21 out.2011.

UFBA. Instituto de Química (Salvador). Cristina Quintella; Odete Gonçalves. **Processo de obtenção de produto biodegradável para aplicação na remediação de solos, águas e ambientes impactados e método de funcionamento**. BR n. PI 1004444-2 A2, 03 mar. 2010, agosto 2011.

WIPO. **Tratado de cooperação em matéria de patentes**. Disponível em:

<<http://www.wipo.int/pct/pt/treaty/about.html>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

XU, R.; LAU, A.N.L.; LIM, Y.G.; OBBARD, J.P. Bioremediation of oil-contaminated sediments on an inter-tidal shoreline using a slow-release fertilizer and chitosan. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, p.1062-1070, 2005.

## APÊNDICES

A – O Enxofre no petróleo, sua contribuição para a biorremediação .....	93
B – Mistura Microbiológica .....	94
C – Esquema da composição dos nutrientes com diagrama da biorremediação	95
D – Coleta de campo e extração dos hidrocarbonetos com separação das alíquotas para cromatografia. ....	96
E – Tomada de parâmetros físico-químico das simulações .....	97
F – Resultados e discussão da validação em Cromatografia e XRF.....	98
G – Extrações dos hidrocarbonetos .....	99
H – Carta Patente de Invenção I .....	100
QUINTELLA, C.; GONÇALVES, O.; <b>Processo microbiológico para captura de voláteis e produção de biopolímero proteico.</b> Depósito Patente de Invenção UFBA em 21/10/2011, em sigilo .....	
I – Carta Patente de Invenção II .....	114
QUINTELLA, M. C.; GONÇALVES, O.; TRIGUIS, A. J.; BR PI UFBA Patente 221109478199 - <b>Processo para obtenção de biossensores e biossensores</b> , 2011.	
J – Carta Patente de Invenção III .....	127
QUINTELLA, M. C.; GONÇALVES, O.; BR PI UFBA Patente; Em sigilo- <b>Estação de tratamento subterrânea para derrames de petróleo ou esgoto com aplicação de Mistura Microbiológica e método de funcionamento</b> , 2012.	

## APÊNDICE A – O Enxofre no petróleo, sua contribuição para a biorremediação.

O petróleo parafínico possui em sua matriz orgânica hidrocarbonetos alifáticos e cíclicos. Aqueles se dividem em: n-alcanos ou parafinas, alcanos ramificados ou isoprenóides e alcenos, enquanto estes são divididos em ciclos alcanos ou naftalenos e aromáticos. Em média, o petróleo detém cerca de 30% de alcanos, 50% de ciclo alcanos e 15% de aromáticos (UNEP, 1991). O enxofre, por sua vez, é o terceiro elemento mais encontrado no petróleo, com concentração média de 0,65%, em peso, e uma faixa que apresenta valores entre 0,02 e 4,00%. Este elemento pode ocorrer no petróleo nas formas de sulfetos, polissulfetos, benzotiofenos e derivados, moléculas policíclicas com nitrogênio e oxigênio, gás sulfídrico, dissulfeto de carbono, sulfeto de carbonila e enxofre elementar. No caso dos compostos sulfurados, verifica-se que, além de indesejáveis, aumentam a polaridade, tornando-se responsáveis pela corrosividade dos produtos petrolíferos, cor e cheiro. Além do mais, são tóxicos e produzem  $\text{SO}_2$  e  $\text{SO}_3$  por combustão, gases altamente poluentes da atmosfera, os quais formam  $\text{H}_2\text{SO}_3$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em meio aquoso (RIBEIRO, 2009).

## APÊNDICE B –Mistura Microbiológica e esquema da composição dos nutrientes.

Para o processo de biorremediação no experimental de campo foi desenvolvida a Mistura Microbiológica, primeiramente em bancada, depois esta foi adaptada e aumentada em suas proporções para aplicação na semeadura. Foram adicionados os fungos *Aspergillus* spp ou *Penicillium* spp, com petróleo exsudado, distribuídos em 10 placas de Petri, para serem replicados. Em seguida, foram separados os produtos e quantificados (Tabela 01) com adaptação equivalente proporcional à tabela de Depósito de Patente PI UFBA (QUINTELLA; GONCALVES, 2010) citada (*artigo 2*).

**Tabela 01:** Quantificação dos produtos da mistura microbiológica

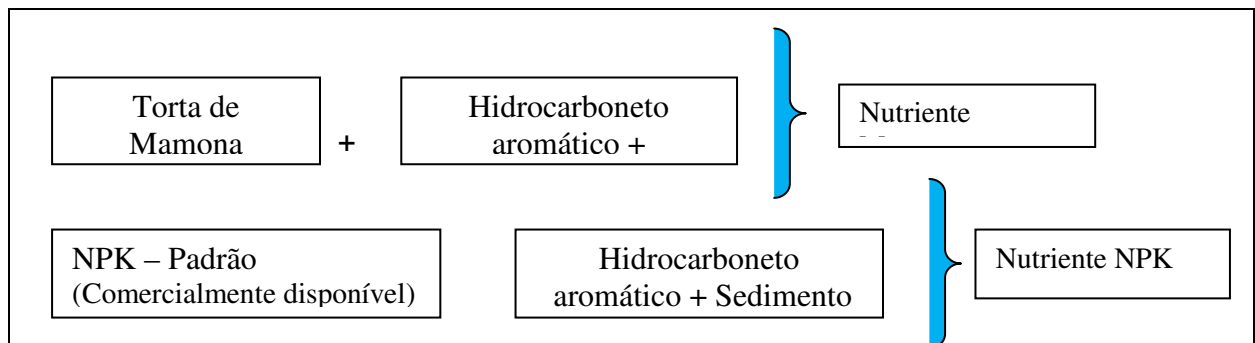
<i>Produto</i>	<i>Peso (g)</i>
Petróleo	39,75
Glicerina bruta	38,46
Torta de mamona	10,11
Areia calcinada	115,38
Sedimento manguezal	15,00
Água de produção	75,00
Total	293,70 g
Fungos	Cepas

Cada amostra foi homogeneizada individualmente, levada ao aquecedor agitador magnético por 4 min, na temperatura aproximada de 87°C, e retirada para acrescentar cepas de fungos da semeadura. Em seguida, foi colocada cada amostra nas provetas, já instaladas nos aquários. Fez-se o acompanhamento das unidades de simulação, durante o período de 8 semanas, e quando foram monitorados, semanalmente, os parâmetros físico-químicos não conservativos (pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido).

### APÊNDICE C – Esquema da composição dos nutrientes.

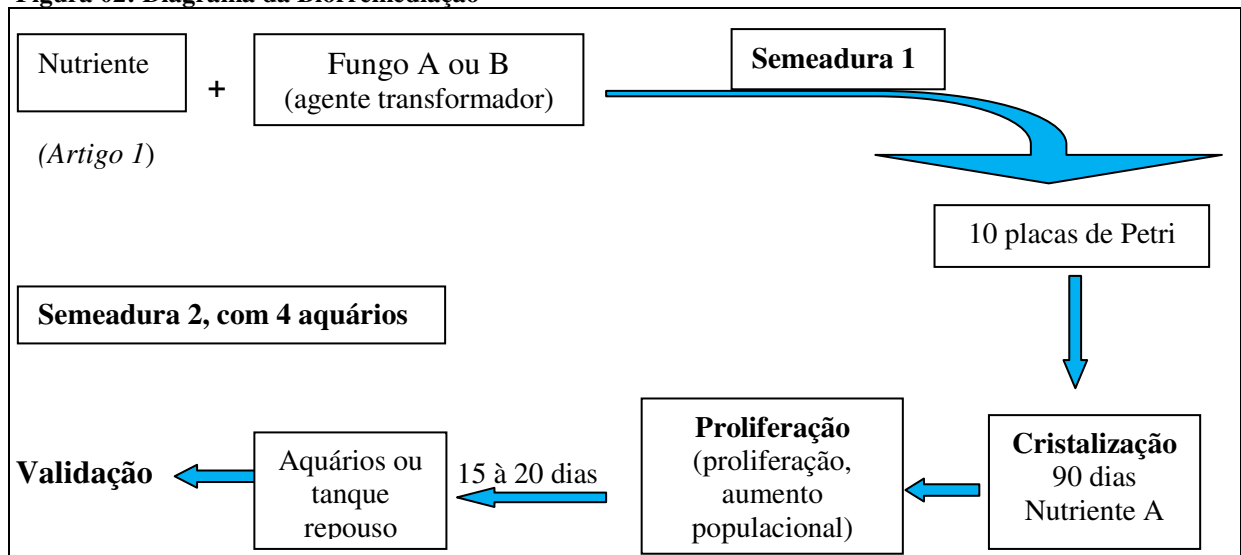
A **Mistura Microbiológica** estudada, neste trabalho é composta principalmente por (Figura 01) glicerina bruta, torta de mamona, fertilizante NPK10-10-10 e os fungos *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. A glicerina bruta, é utilizada como produto surfactante, pois contém uma mistura de glicerina, ácidos, ésteres, álcalis e álcoois, óleo, glicerídeos, água e sais variados. Já se encontra bem documentado a capacidade do biosurfactante de emulsionar misturas de hidrocarboneto e água. Tal propriedade envolve o aumento significativo de degradação dos hidrocarbonetos e, por isso, é utilizado na biorremediação de solos impactados e mananciais contaminados (LOBATO, 2000; CRAPEZ *et al.*, 2002).

**Figura 01:** Esquema da composição dos nutrientes.



O crescimento de microrganismos em um interface de água e óleo favorece o aparecimento de um biofilme, no qual os microrganismos se aderem à superfície de grandes gotas de óleo, passando a formar uma delgada interface, extraindo os compostos insolúveis em água da fase oleosa e utilizando os sais minerais da fase aquosa. Foram feitas duas sementeiras e foram analisados seus processos de biotransformações (Figura 02).

**Figura 02: Diagrama da Biorremediação**





## APÊNDICE D – Coleta de campo e extração dos hidrocarbonetos para cromatografia

Para cromatografia as amostras coletadas (Figura 3), foram inicialmente congeladas, depois colocadas no liofilizador em seguida foram maceradas, peneiradas e pesadas preparadas para a extração no *sofxlet*.

**Figura 03:** Coleta de sedimento no manguezal



A manta de aquecimento foi ligada em 300° C, o que possibilitará arrastar todo o óleo que tiver na amostra para depois fracionar. Para tanto, são utilizados os equipamentos: extrator, condensador e manta de aquecimento (Figura 04) a fim de obter a separação das alíquotas de saturados, aromáticos e NSO, após a duração de 4 horas.

**Figura 04:** Tratamento e separação das alíquotas para cromatografia



#### APÊNDICE E – Tomada de parâmetros físico-químico das simulações.

Fez-se o acompanhamento das unidades de simulação, durante o período de 8 semanas, e quando foram monitorados, semanalmente, os parâmetros físico-químicos não conservativos, como indica na Figura (Figura 05). (pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido) foram mensurados com auxílio dos seguintes equipamentos:

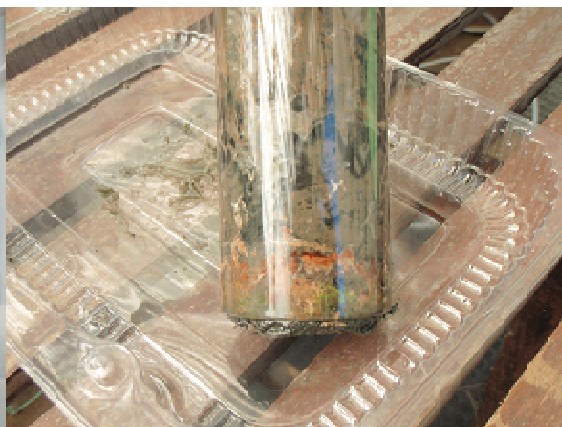
- Refratômetro Hand Refractometer ATAGO modelo S/Mill-E;
- Condutivímetro Handylab 1, com precisão de  $0,05\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;
- pH-metro Handylab LF1, com precisão de 0,01 unidade de pH e/ou mVe;
- Oxímetro WTW OXI 3151, marca SCHOTT-GERATE, precisão de  $0,01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Durante o período do experimento, o sedimento mostrou-se com cores estriadas, conforme mostra a proveta com processo em biorremediação (Figura 06). O que se levou a fazer análise de Aflatoxina para eliminar suspeitas de produção tóxica ao ambiente. Após análise, obteve-se resultado negativo, já pela 2ª vez sem prejuízo ao meio ambiente. Tornando-se assim um trabalho cientificamente comprovado e que invalida qualquer suspeita de contaminação. Atento ainda quanto às transformações, que visualmente, pode-se observar como a proliferação de larvas, pequenos Nematódeos, na biorremediação e até pequenos insetos voadores, o que caracteriza a matéria orgânica em abundância e existência de vida.

**Figura 05-** Tomada de parâmetros físico-químico das simulações



**Figura 06 –** Mistura Microbiológica com processo de biorremediação em estrias.



APÊNDICE F – Resultados e discussão da validação em Cromatografia e XRF.

Para os inorgânicos foi investigado Fluorescência de Raios-X (XRF) no óleo total de todas as simulações nas 8 semanas, e nas alíquotas dos saturados dos *Aspergillus* spp (Quadro 1). Obtendo-se assim para cada semana 4 amostras, duas de bioaugmentação com fungos e duas de bioestimulação com os nutrientes num total de 32 amostras.

**Quadro 01:** Resultados e discussão da validação em Cromatografia e XRF

	<b>Cromatografia</b>	<b>XRF</b>	<b>Cromatografia</b>	<b>XRF</b>
<b>Fungo</b>	<b>Resultado mamona</b>	<b>Resultado mamona</b>	<b>Resultado NPK</b>	<b>Resultado NPK</b>
<i>Aspergillus</i> spp	R <sub>1</sub> mamona R <sub>2</sub> mamona R <sub>3</sub> mamona R <sub>4</sub> mamona R <sub>5</sub> mamona R <sub>6</sub> mamona	R <sub>1</sub> mamona R <sub>2</sub> mamona R <sub>3</sub> mamona R <sub>4</sub> mamona R <sub>5</sub> mamona R <sub>6</sub> mamona	R <sub>1</sub> NPK R <sub>2</sub> NPK R <sub>3</sub> NPK R <sub>4</sub> NPK R <sub>5</sub> NPK	R <sub>1</sub> NPK R <sub>2</sub> NPK R <sub>3</sub> NPK R <sub>4</sub> NPK R <sub>5</sub> NPK
<i>Penicillium</i> spp	R <sub>1</sub> mamona R <sub>2</sub> mamona R <sub>3</sub> mamona R <sub>4</sub> mamona R <sub>5</sub> mamona	R <sub>1</sub> mamona R <sub>2</sub> mamona R <sub>3</sub> mamona R <sub>4</sub> mamona R <sub>5</sub> mamona	R <sub>1</sub> NPK R <sub>2</sub> NPK R <sub>3</sub> NPK R <sub>4</sub> NPK R <sub>5</sub> NPK	R <sub>1</sub> NPK R <sub>2</sub> NPK R <sub>3</sub> NPK R <sub>4</sub> NPK R <sub>5</sub> NPK
<i>Aspergillus</i> spp	R <sub>2(1)</sub> mamona		R <sub>2(1)</sub> NPK	
<i>Penicillium</i> spp	R <sub>2(1)</sub> mamona		R <sub>2(1)</sub> NPK	

Também foram acompanhadas as prováveis alterações sofridas por compostos aromáticos alquilados (ROQUES; OVERTON; HENCY, 1994), utilizando o Cromatográfico a Gás (CG) Factor Four Variam 3900. Estes procedimentos forneceram os perfis denominados *fingerprints*, que indicam quais os compostos do óleo presentes e suas alterações à medida que os microrganismos degraderam os contaminantes.

Para investigação orgânica dos hidrocarbonetos nas 8 semanas foram feitas as análises de cromatografia líquida do óleo total, dos saturados, de todas as amostras das simulações e cromatografia gasosa e líquida das amostras de *Aspergillus* spp com mamona.

## APÊNDICE G – Extrações dos hidrocarbonetos.

Ainda para cromatografia foram separadas as alíquotas de saturados e aromáticos (FIGURA 07 e FIGURA 08). As amostras do sedimento em biorremediação inicialmente foram colocadas no liofilizador para secar, depois foi feito os procedimentos de extração. Em seguida procedeu-se a transferência de amostras dos balões para os vidros vials, fez-se necessário usar o mesmo solvente para a solução das frações, cada um com seu solvente próprio. Estes foram medidos para cada alíquota de extração e obtiveram-se três frações das amostras, hidrocarbonetos saturados, aromáticos e NOS (nitrogênio, enxofre, oxigênio).

**Figura 07-** Coluna p/ alíquotas de Saturados, Aromáticos e NOS



**Figura 08:** Extração do óleo das amostras



## Apêndice H – Carta Patente de Invenção I.

5 **QUINTELLA, C.;; GONÇALVES, O.; Processo microbiológico para captura de voláteis e produção de biopolímero proteico. Depósito Patente de Invenção UFBA em 21/10/2011, em sigilo**

**PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO**

**Campo da invenção**

10 A presente invenção trata da produção de biopolímeros obtidos sob a forma uma película resistente e gelatinosa. Tais biopolímeros são provenientes da reação de hidrocarbonetos do petróleo e outras fontes e proteínas vegetais armazenadas como energia em células de fungos. Os referidos fungos metabolizam esses materiais, devolvendo ao ambiente o residual sintetizado.

15 **Fundamentos da invenção**

É conhecido da literatura técnica especializada que os manguezais são ecossistema costeiro abrigados, de ocorrência no encontro das águas dos rios com água do mar, sendo assim sujeitos ao regime das marés. Eles se desenvolvem em regiões de alta temperatura e precipitação e com terrenos apropriados. No entanto, sua vegetação não é rica em diversidade, sendo composta por árvores e arbustos pertencentes a famílias que apresentam grande tolerância a águas salgadas e salobras.

20 Ecossistemas de manguezal são grandemente sensíveis a distúrbios antrópicos, como a contaminação por petróleo ou por outros produtos tóxicos, que podem causar danos a toda a biota, exercendo impacto por longo prazo.

25 A retirada de uma fonte poluidora de um local, contudo, não significa a interrupção imediata de seus impactos, pois o acúmulo de substâncias tóxicas no ambiente pode ter seus efeitos multiplicados por um longo prazo, atingindo inclusive a saúde humana. Em caso de contaminação por óleo, este pode persistir no ecossistema de manguezal por anos, e as técnicas que permitam limpar ou remover o petróleo são limitadas.

30 Uma técnica que se mostrou promissora para a recuperação de manguezais contaminados é a biorremediação. São utilizados processos naturais realizados por microrganismos que utilizam os poluentes como fonte de carbono em seus processos

metabólicos para remediação de uma área impactada, acelerando a biodegradação natural de contaminantes como hidrocarbonetos e outros compostos perigosos, reduzindo a concentração ou a toxicidade desses compostos, ou ambos.

5 As contaminações com hidrocarbonetos do petróleo e outras fontes, são distúrbios que modificam o ambiente natural e sua capacidade de auto-renovação. Nesse sentido, vê-se que o benefício maior da aplicação da biorremediação é a mineralização, obtendo como produto final CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pela via aeróbica, assim como formação de biomassa.

10 Para Uña e Garcia [Biodegradation of non-ionic dispersants in sea water **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology** v. 18, n. 5, p. 315-319, 1983], a transformação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos pode ser facilitada pela produção de enzimas como catalisadores biológicos que controlam as reações bioquímicas, produzindo energia e material necessário para a proliferação de novas células microbianas.

15 Os fungos produzem enzimas extracelulares oxidativas capazes de quebrar compostos policíclicos aromáticos de cadeia longa e transformá-los em compostos assimiláveis ao seu metabolismo. Estas enzimas hidrolisam ligações peptídicas, liberando peptídeos que são degradados a aminoácidos livres pelas peptidases [RODWELL, V. W.; Catabolism of Proteins & Amino Acid Nitrogen, **Biomedical**  
20 **Importance**, Japão, n. 28, 2009]. Importante salientar, também, que estudos indicam o aumento da biodisponibilidade de policíclicos aromáticos (HPAs), aumento da taxa de solubilização dos metais pesados e aumento de solubilização de naftalenos pelo uso de biossurfactantes [NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M., Biossurfactantes propriedades e aplicações, **Quím. Nova**, Campinas, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002].

25 A biorremediação através de processos de óxido-redução atinge a degradação e a mineralização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e de compostos fenólicos em solo de manguezal impactado com petróleo e outros. Isto se verifica quando do processo de transformação das substâncias, inicialmente, em fermentação, emitindo dispersão de gases (partículas menores). Em seguida, dá-se o efeito das  
30 emulsões, passando para a água as partículas solúveis com trocas iônicas e, finalmente, acontece, no substrato, as transformações físico-químicas produzidas pelos microrganismos para o seu metabolismo e assimilação.

Os fungos estão presentes, no cotidiano, possuem um corpo vegetativo chamado talo ou soma que é composto de finos filamentos unicelulares chamados hifas. Estas, formam uma rede microscópica junto ao substrato (fonte de alimento), chamada micélio, por onde o alimento é absorvido. Os micélios podem ser cenocítico ou septado. A célula fúngica é uma estrutura similar a células animais, porém, com parede celular distinta [CLÉCIO, E. **Conceito sobre fungos**. 07 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.jornalivre.com.br/87590/conceito-sobre-fungos.html>>. Acesso em: 14 jan. 2011].

O crescimento de microrganismos em uma interface de água e óleo favorece o aparecimento de um biofilme, no qual os microrganismos se aderem à superfície de grandes gotas de óleo devido à hidrofobicidade das células, passando a formar uma delgada interface, extraindo os compostos insolúveis em água da fase oleosa e utilizando os sais minerais da fase aquosa. À medida que as células revestem as gotas de óleo produzindo biossurfactantes, reduz-se a tensão interfacial, o que favorece o crescimento e a colonização microbiana [MARTINS, V. G. Produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido e sua utilização em biorremediação **Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005**].

Os fungos filamentosos são os mais eficientes na produção de enzimas extracelulares oxidativas, dentre elas proteases, celulasas, ligninases e outras [SANTAELLA, S. T. *et al.*, Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger* **Eng Sanit Ambient**, v. 14, n.1, p. 139-148, jan./mar. 2009]. Pelo processo das enzimas proteases, as partículas metálicas que as compõem, se expõem em maior quantidade no meio aquoso salino, possibilitando um aumento de frações nanométricas que, ao se reagruparem, interagem, provocando a mineralização do substrato.

A torta de mamona, oriunda da *Ricinus communis*, é uma fonte de energia para os microrganismos heterotróficos, modificando a atividade enzimática, além de favorecer a soimobilização de compostos minerais e inibir o efeito de algumas toxinas [CAVALCANTI, F. J. A. (Coord.) **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: 2ª aproximação**. 2. ed. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 1998]. A ricina é uma proteína inativadora de ribossomos (RIPs) do

tipo II, heterodimérica, com a enzima inibidora de ribossomo (~32 KDa, cadeia A ou RTA) ligada por ponte dissulfeto a uma lectina galactose (~34KDa, cadeia B ou RTB). Já a cisteína é uma metalo-protease que usa um íon metal no seu mecanismo catalítico e hidrolisa as proteínas em aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células, uma vez que possui um papel despolimerizante [ALVAREZ-SANCHEZ, M. E. A. *et al.*, A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity, **Microbial pathogenesis**, v. 28, p. 193-202, 2000].

A presente invenção é o resultado de pesquisa desenvolvida para tratar de biorremediação de manguezais e que utiliza os resíduos terminais do processo de biorremediação capturando e aprisionando os óxidos liberados pelos fungos para a solução salina, transformando-os em um tecido de filme, formando uma fina película.

#### **Breve descrição das figuras**

A Figura 1 apresenta um espectro de infravermelho, resultante da análise da película de biopolímero.

A Figura 2 apresenta o resultado da análise estatística PCA por fluorescência de Raios-X, separando os produtos da amostra sedimento.

A Figura 3 apresenta uma fotografia da película de biopolímero produzido por *Aspergillus* spp.

A Figura 4 apresenta uma fotografia da película de biopolímero produzido por *Penicillium* spp.

#### **Sumário da invenção**

A presente invenção refere-se a um processo microbiológico para captura de voláteis na produção de biopolímero protéico. Mais especificamente, à produção de biopolímeros compactados, película filamentososa, proveniente de sedimento manguezal contaminado com hidrocarboneto do petróleo ou outros e proteínas vegetais armazenadas como energia em células dos fungos. Ditos fungos utilizam estas substâncias para sua co-metabolização devolvendo ao ambiente o residual sintetizado (biopolímero), o qual possui larga variedade de aplicação na indústria de produtos e revestimentos e na área medicinal.

Mais particularmente a presente invenção refere-se a um filme de película sintetizado por um grupo protéico amida com moléculas e elementos minerais essenciais à vida, produtores de biomassa com utilização em outros processos de



formação e aplicação industrial.

O referido processo consiste em:

- 5 a) preparar uma mistura microbiológica contendo entre 80 – 85% de manguezal contaminado com petróleo, 1 – 5% de glicerina bruta, 1 – 6% de torta de mamona e 5 – 10% de água de produção;
- b) semear cepas de fungos filamentosos, selecionados entre *Aspergillus flavus* e *Penicillium sp* ou outras espécies de fungos filamentosos;
- 10 c) injetar a mistura microbiológica semeada em tubulações dotadas de tela de contenção em sua parte inferior para armazenagem de amostras compostas, retiradas do substrato do manguezal, ditas tubulações sendo distribuídas em tanques contendo solução salina;
- d) aguardar a proliferação fúngica e a formação do biopolímero.

#### **Descrição detalhada da invenção**

15 Para que a invenção possa ser mais bem compreendida e avaliada, sua descrição detalhada será feita a seguir, com base nos experimentos realizados em laboratório.

A área estudada é representativa do sistema Bioma Mata Atlântica no ecossistema manguezal, inserida na Bacia sedimentar do Recôncavo Baiano como unidades litológicas que compõem essa bacia. Estas são essencialmente compostas por sequências de conglomerados, arenitos, siltitos e folhelhos. Quanto ao petróleo do Recôncavo Baiano, devido a sua origem, a partir de matéria lacustre, tem composição dominante de parafinas e cadeias normais diferenciando-se, assim, do petróleo de outras bacias sedimentares. Em virtude disso, a precipitação de parafinas, diminui gradativamente o fluxo de oxigenação dos sedimentos de manguezais, 25 provocando contaminações compactas no interior dos sedimentos e, conseqüentemente, dificultando o processo de remediação.

O enxofre, por sua vez, é o terceiro elemento mais abundante encontrado no petróleo, com concentração média de 0,65%, em peso, e uma faixa que apresenta valores entre 0,02 e 4,00%. Este elemento pode ocorrer no petróleo nas formas de sulfetos, polissulfetos, benzotiofenos e derivados, moléculas policíclicas com 30 nitrogênio e oxigênio, gás sulfídrico, dissulfeto de carbono, sulfeto de carbonila e enxofre elementar.

Para simular o processo de biorremediação utilizou-se um consórcio de subprodutos da 1ª geração de biocombustíveis – glicerina bruta e torta de mamona – empregados como bioestímulo e associados aos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp ou outras espécies de fungos com a proteína vegetal inibidora ricina da mamona no processo da fermentação alcoólica.

O processo de biorremediação foi efetuado em tanques, contendo solução salina e 8 tubulações distribuídas no seu interior, as referidas tubulações dotadas de tela de contenção em sua parte inferior para armazenagem de amostras compostas, retiradas do substrato do manguezal. Foram coletados sedimentos contaminados, homogeneizados e utilizados para compor a mistura microbiológica responsável pela biorremediação efetuada.

A mistura microbiológica preparada para o ensaio possuía a seguinte composição (w/w): 600 g de substrato manguezal contaminado com petróleo exsudado; 24,60 g glicerina bruta; 34,40 g de torta de mamona; e 50 mL água de produção, mais a adição de cepas do fungo.

Os componentes foram pesados e misturados sob agitação com aquecimento à temperatura na faixa de 85-90°C durante 4 minutos, para solubilizar o petróleo. Em seguida foi colocado nas tubulações e acrescentado o fungo - *Aspergillus* spp ou *Penicillium* spp ou outras espécies de fungo. A tela de contenção na parte inferior das tubulações permite a liberação de substâncias com trocas iônicas dentro do tanque contendo a solução salina. Após 4 dias observou-se a geração de uma camada de emulsão oleosa acima da solução e turvação da solução. Com 30 dias já havia a formação de uma película fina.

Observou-se que a simulação com o fungo *Aspergillus* sp, e/ou outros, e o bioestímulo torta de mamona gerou, em cima da solução salina, uma camada de emulsão oleosa, que passou a ficar escura e turva nos dias seguintes. A fermentação e formação de emulsão continuavam a ocorrer à medida que a película ia se formando, a solução salina tornava-se clara, sem espuma, porém com um pouco limo verde, e resíduo de sedimento no fundo.

Após 35 dias passou a formar-se uma película no fundo. Na parte superior, das tubulações havia bastante proliferação de fungos com rajadas de cor amarelo, indicando a presença de enxofre ou outros minerais. Com 50 dias o sedimento no

interior das tubulações encontrava-se mais seco, resultado do processo de hidrólise da cisteína da ricina uma metalo-protease, devido ao processo microbiano de retirar do sedimento o oxigênio para sua energia, desidratando o sedimento.

5 Ao adicionar hipoclorito de sódio (para limpeza na película), observou-se que a cor mudou de verde para amarelo, além da fermentação com liberação de bolhas gasosas na solução salina.

Foram realizadas análises de Infravermelho, Fluorescência de Raios-X, e Difractometria de Raios-X, com o objetivo de identificar tais produtos.

10 Foi possível identificar na película de biopolímeros uma enzima protéica Amida orgânica com numero de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) de 3.419 NH associado com aminas secundárias; em comprimento de onda de 2.848 em Amida A em 1.647 C=C vibração aromáticos e  $\text{NO}_2$  em 1.548 banda forte e a partir de 1.087 S=O (sulfóxido) e compostos halogênios em alfa por análise de infravermelho, conforme evidenciado no espectro da análise por infravermelho mostrado na Figura 1.

15 Complementando a investigação, no resultado da análise de fluorescência por Raios-X, destacam-se os elementos inorgânicos minerais que contribuem para a composição do biopolímero, película membranar, cuja composição química é constituída de 99.822 % de material orgânico (CHO) e somente 0.2 % de minerais distribuídos entre enxofre 0,053%, cálcio 0,041%, potássio 0,041%, ferro 0,025%,  
20 titânio 0,009%, bromo 0,007% e cromo 0,001 %. (Figura 2).

Este resultado nos permite afirmar ser uma película microbiológica orgânica, mais purificada naturalmente, com menor índice de impureza residual ou silicato, com massa consistente, e compacta.

25 Ressalte-se que o mineral titânio mostrou-se com o mesmo percentual nas películas formadas por ambos os fungos – *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. Sendo este mineral inerte contribui para a não rejeição em organismos, visto que tem a tendência de acumular-se nos tecidos biológicos, o que serve como indicativo para sua aplicação na área biomédica.

30 Assim, em um primeiro aspecto a presente invenção disponibiliza um tecido microbiológico resistente e gelatinoso, filme membranar para emprego nas mais diversas áreas de biotecnologia avançada medicinal de transplante ósseo.

Em um segundo aspecto, viabiliza tanto a um processo de transferência de

elétrons entre as proteínas de ferro/enxofre quanto à obtenção de um produto biopolímero emulsificado em solução salina para aplicação no interior de dutos, permitindo a proteção do aço e maior fluidez do óleo. Ou seja, oferece um processo de obtenção de uma película anti-corrosiva para emprego de revestimento de dutos

5 metálicos no transporte e indústria petroquímica.

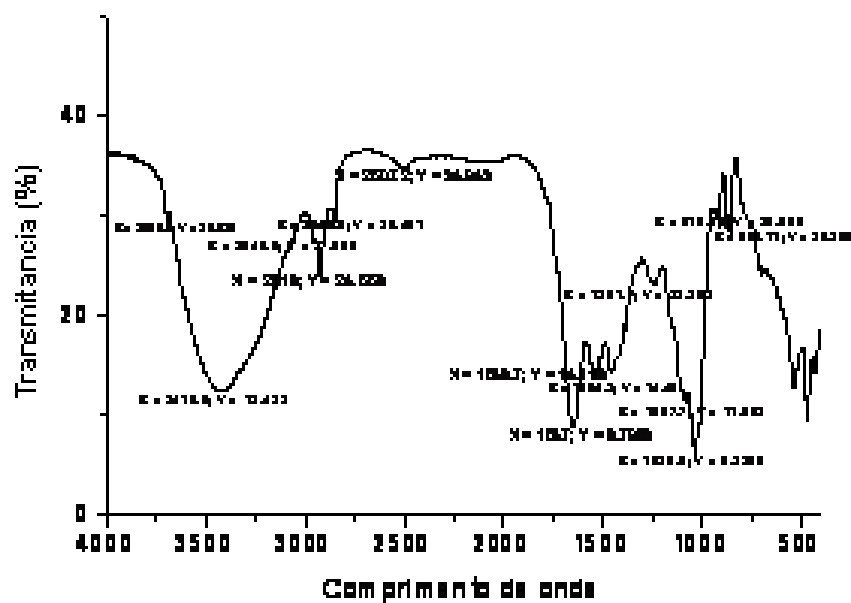


FIG. 1

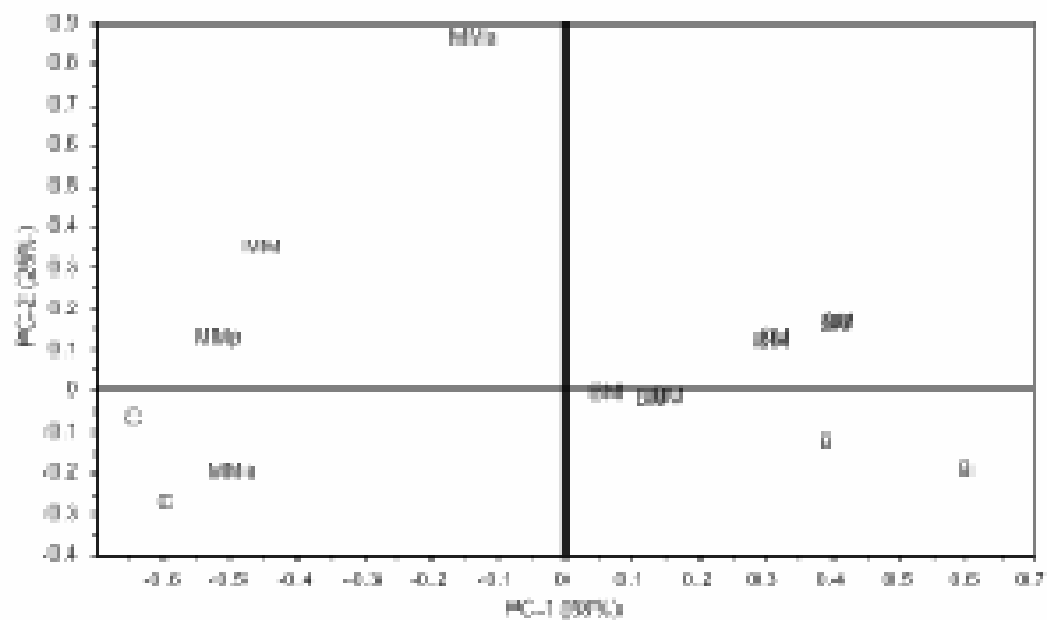
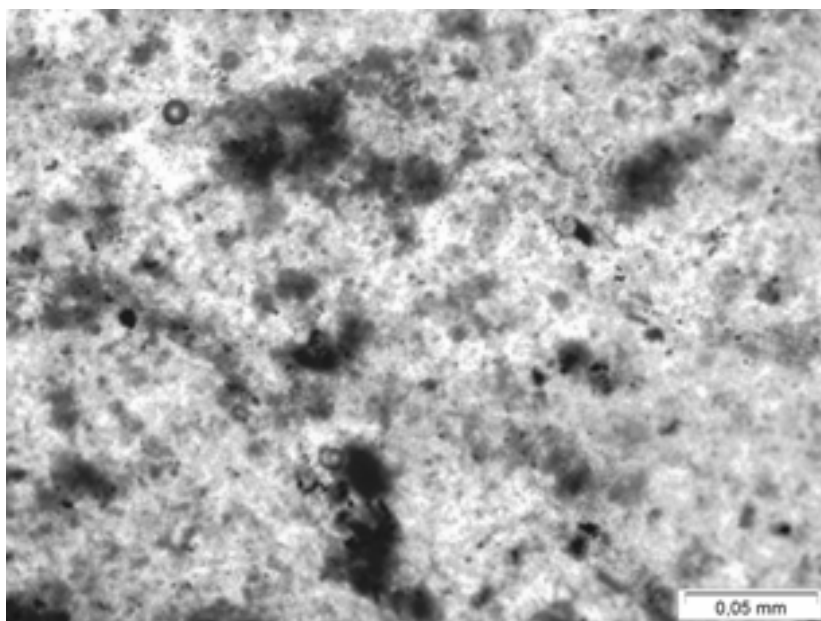
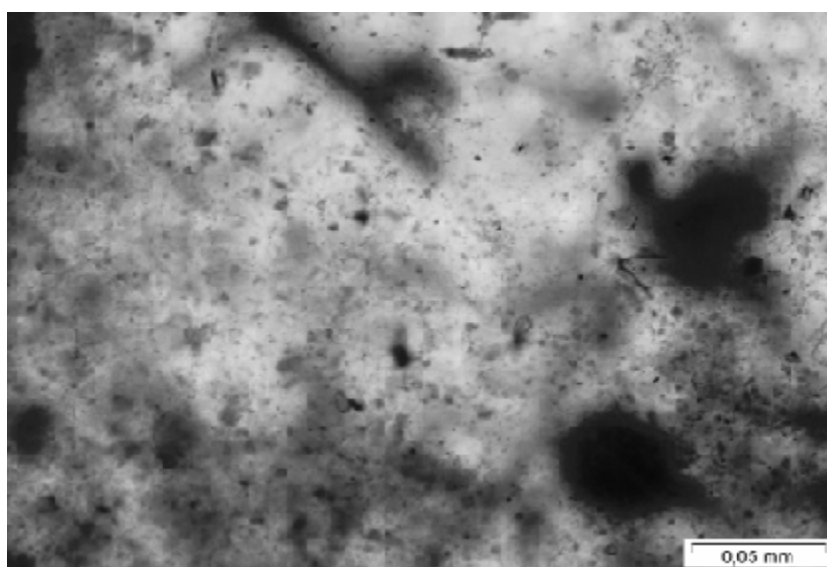


FIG. 2

**FIG. 3****FIG. 4**

## REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO **caracterizado por** compreender as etapas de:
  - 5 a) preparar uma mistura microbiológica contendo entre 80 – 85% de maguezal contaminado com petróleo, 1 – 5% de glicerina bruta, 1 – 6% de torta de mamona e 5 – 10% de água de produção;
  - b) semear cepas de fungos filamentosos, selecionados especialmente entre *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, e outros.
  - 10 c) injetar a mistura microbiológica semeada em tubulações dotadas de tela de contenção em sua parte inferior para armazenagem de amostras compostas, retiradas do substrato do maguezal, ditas tubulações sendo distribuídas em tanques contendo solução salina
  - d) aguardar a proliferação fúngica e a formação do biopolímero.
- 15 2. PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar os resíduos terminais do processo de biorremediação capturando e aprisionando os óxidos liberados pelos fungos para a solução salina, transformando-os em um tecido de filme, formando uma fina película.
- 20 3. PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** produzir biopolímeros compactados, elásticos, termoplásticos provenientes de hidrocarboneto do petróleo, e outros óleos, e proteínas vegetais armazenadas como energia nas células dos fungos.
- 25 4. PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** produzir um filme de película sintelizado por um grupo protéico amida com moléculas e elementos minerais essenciais à vida, produtores de biomassa.
- 30 5. PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o biopolímero, película membranar, apresentar composição

química constituída predominante de material orgânico (CHO) e somente até 2 % de minerais distribuídos entre enxofre, cálcio, potássio, ferro, titânio, bromo e cromo.

6. PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO de acordo com a reivindicação 1 e 4, **5** caracterizado por a composição química do biopolímero, película membranar, ser constituída de 99.822 % de material orgânico (CHO) e somente 0.2 % de minerais distribuídos entre enxofre 0,053%, cálcio 0,041%, potássio 0,041%, ferro 0,025%, titânio 0,009%, bromo 0,007% e cromo 0,001 %.
7. PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS NA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO de acordo com a reivindicação 1, **10** caracterizado por a película de biopolímero conter uma enzima protéica Amida orgânica com numero de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) cerca de 3.419 NH associado com aminas secundárias; em comprimento de onda cerca de 2.848, corresponde a Amida A em cerca de 1.647 C=C vibração aromáticos e  $\text{NO}_2$  em cerca de 1.548 banda forte e a partir de cerca de 1.087, atribuída a S=O (sulfóxido) e compostos halogênicos em alfa. **15**
8. PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por produzir um tecido microbiológico resistente e gelatinoso, filme membranar, para emprego na área biomédica, em particular na área de biotecnologia **20** avançada medicinal de transplante ósseo.
9. PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por produzir um biofilme gelatinoso, película membranar, anti-corrosiva, para emprego de revestimento de dutos metálicos no transporte e indústria **25** petroquímica.
10. BIOPOLÍMERO PROTEICO obtido de acordo com o processo da reivindicação 1, caracterizado por apresentar composição química constituída predominante de material orgânico (CHO) e somente até 2 % de minerais distribuídos entre enxofre, cálcio, potássio, ferro, titânio, bromo e cromo.
- 30 11. BIOPOLÍMERO PROTEICO obtido de acordo com o processo da reivindicação 1, caracterizado por ser constituída de 99.822 % de material orgânico (CHO) e somente 0.2 % de minerais distribuídos entre enxofre 0,053%, cálcio



0,041%, potássio 0,041%, ferro 0,025%, titânio 0,009%, bromo 0,007% e cromo 0,001 %.

12. BIOPOLÍMERO PROTEICO obtido de acordo com o processo da reivindicação 1, **caracterizado por** conter uma enzima protéica Amida orgânica com
- 5 numero de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) cerca de 3.419 NH associado com aminas secundárias; em comprimento de onda cerca de 2.848, corresponde a Amida A em cerca de 1.647 C=C vibração aromáticos e  $\text{NO}_2$  em cerca de 1.548 banda forte e a partir de cerca de 1.087, atribuída a S=O (sulfóxido) e compostos halogênios em alfa.

**RESUMO**  
**PROCESSO MICROBIOLÓGICO PARA CAPTURA DE VOLÁTEIS E**  
**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO**

A presente invenção refere-se a um processo microbiológico para captura de  
5 voláteis na produção de biopolímero protéico e biopolímero produzido. Mais  
especificamente, à produção de biopolímeros compactados, termoplástico, película  
filamentosa, proveniente de sedimento manguezal contaminado com hidrocarboneto  
do petróleo ou outros e proteínas vegetais armazenadas como energia em células dos  
10 fungos, que utilizam para sua co-metabolização devolvendo ao ambiente o residual  
sintetizado cuja aplicação possui larga variedade na indústria de produtos e  
revestimentos e na área medicinal.

Mais particularmente a presente invenção refere-se a um filme de película  
sintetizado por um grupo protéico amida com moléculas e elementos minerais  
essenciais à vida, produtores de biomassa com utilização em outros processos de  
15 formação e aplicação industrial.

20

25

30

35

## Apêndice I – Carta Patente de Invenção II

QUINTELLA, M. C.; GONÇALVES, O.; TRIGUIS, A. J.; BR PI UFBA Patente 221109478199 - **Processo para obtenção de biossensores e biossensores**, 2011.

5                                    **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSSENSORES E  
BIOSSENSORES**

**Campo da invenção**

A presente invenção trata de um processo para obtenção de um produto salino cristalizado o qual encerra na sua composição uma enzima  
10    protéica com características próprias para emprego na produção de biossensores, os quais têm aplicação na indústria farmacêutica, medicinal, biotecnológica e eletrônica.

Mais especificamente a presente invenção trata de um processo de obtenção de um produto biossensor, o qual é obtido a partir de componentes  
15    voláteis encontrados em manguezais contaminados com hidrocarbonetos. Os produtos obtidos possuem características eletromagnéticas, produzindo um sinal eletrônico proporcional à concentração de determinados elementos presentes em uma amostra.

**Fundamentos da invenção**

20                    A biorremediação é um processo conduzido pela ação de microorganismos como bactérias e fungos, que utilizam os hidrocarbonetos como nutriente, tornando-se responsáveis pela descontaminação de ambientes impactados por petróleo.

Acidentes com derramamentos de petróleo afetam as praias, sendo  
25    carregado pelas correntes marítimas, chegando aos manguezais, onde vem a ser letal para uma variedade de formas de vida, como plâncton, peixes e mariscos, pássaros e mamíferos marinhos.

Com o aumento da produção da indústria petrolífera estes acidentes são mais freqüentes e envolvem cada vez maiores áreas em contaminação  
30    por hidrocarbonetos, necessitando assim de medidas tecnológicas de limpeza. Neste cenário a biorremediação se apresenta como uma técnica vantajosa por ser de baixo custo.

A transformação dos hidrocarbonetos pelos microorganismos pode ser facilitada através da produção de enzimas como catalisadores biológicos as quais controlam as reações bioquímicas, produzindo energia e material necessário para a proliferação de novas células microbianas [UÑA, G. V.;  
5 GARCÍA, M. J. N. - Biodegradation of non-ionic dispersants in sea water - **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology** - v. 18, n. 5, p. 315-319, 1983].

Os fungos produzem enzimas extracelulares oxidativas, capazes de quebrar compostos policíclicos aromáticos de cadeia longa e transformá-los  
10 em compostos assimiláveis ao seu metabolismo. Estas enzimas hidrolisam ligações peptídicas, liberando peptídeos, que são degradados a aminoácidos livres pelas peptidases [RODWELL, V. W. - Catabolism of Proteins & Amino Acid Nitrogen - **Biomedical Importance**, Japão, n. 28, 2009].

Diante dos novos desafios da economia petroquímica a invenção  
15 agora proposta vem abrir portas para inovações orgânicas da ciência na gestão de negócios com desenvolvimento sustentável no campo e responsabilidade social com emprego e renda. Além disso, visa atender aos desafios tecnológicos ambientais, uma vez que a glicerina bruta e a torta de mamona (*Ricinus communis*), são subprodutos do biodiesel, sendo  
20 renováveis e juntamente com fungos anaeróbicos facultativos, elaboram uma fermentação no sedimento argiloso do manguezal.

### **Breve descrição das figuras**

A Figura 1 apresenta duas fases da cultura de fungos em placa de Petri.

25 A Figura 2 apresenta o espectro resultante da análise de infravermelho realizado no produto obtido.

### **Sumário da invenção**

A presente invenção trata de um processo para obtenção de um produto salino cristalizado o qual encerra na sua composição uma enzima  
30 protéica com características próprias para emprego na produção de biossensores, os quais têm aplicação na indústria farmacêutica, medicinal, biotecnológica e eletrônica.

Mais especificamente, a invenção trata de um processo para obtenção de um produto biossensor, que compreende uma proteína amida obtida a partir da reação de cristalização em meio salino de contaminantes voláteis de manguezais, quando submetidos à processo de biorremediação com fungos *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, dentre outros. Obtém-se um produto que possui uma enzima com características eletromagnéticas capaz de produzir um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração de determinados elementos químicos (analito ou grupo de analitos) quando presentes em uma amostra, os quais interagem com o elemento biossensível, tornando possível sua identificação.

Mais particularmente o processo da presente invenção é empregado para obtenção de uma proteína com a molécula amida enzimática, que processada em cristais de halita com compostos metálicos reativos específicos, é responsável por detectar mecanismos que viabilizem a produção de biossensores.

#### **Descrição detalhada da invenção**

De modo a permitir que a invenção possa ser mais bem compreendida e avaliada, sua descrição será feita a seguir, com base nos experimentos realizados em laboratório.

A invenção trata de um processo para obtenção de um produto biossensor, que compreende uma proteína amida obtida a partir da reação de cristalização em meio salino de contaminantes voláteis de manguezais, quando submetidos à processo de biorremediação com fungos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp ou outros.

No caso do processo de biorremediação estudado, utiliza-se de um consórcio de subprodutos da primeira geração de biocombustíveis – glicerina bruta e torta de mamona – utilizados como bioestímulo e associados aos fungos com a proteína vegetal inibidora ricina da mamona no processo da fermentação alcoólica. Para a biorremediação de áreas impactadas de manguezal é utilizado o método de bioaumento dos microorganismos com a adição dos fungos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp ou outros.

Para a realização de experimentos, preparou-se uma mistura microbiológica para simular a biorremediação de um manguezal contaminado com resíduos da indústria do petróleo. A mistura experimental apresenta a seguinte composição, expressa em % em peso:

- 5 a) água de produção – solução salina obtida da indústria de petróleo, na faixa de 20 a 30%;
- b) glicerina bruta – na faixa de 10 a 15%;
- c) biomassa residual – torta de mamona (possuindo toxicidade, devido à presença de ricina, e, aminoácido cisteína), na faixa de 1 a
- 10 5%;
- d) sedimento argiloso de manguezal contaminado – na faixa de 15 a 25%, (contendo petróleo e metais de transição alcalino);
- e) areia calcinada - 40 a 50%
- f) agente biológico – cepas do fungo *Aspergillus* spp,
- 15 *Penicillium* spp ou outros.

A análise do sedimento contaminado indicou a presença de compostos minerais e elementos inorgânicos.

A mistura foi agitada e aquecida a uma temperatura na faixa entre 70 e 90°C durante cerca de 3 minutos e a seguir distribuída em placas de Petri com tampa, onde posteriormente será semeado o fungo *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp ou outros. Após a semeadura o material for deixado em repouso.

20

#### **Exemplo: Preparo de uma mistura microbiológica a ser estudada**

Foi preparada uma mistura microbiológica contendo a seguinte

25 composição (w/w): 13,6% de petróleo, 13,2% de glicerina bruta, 3,4% de torta de mamona, 26,6% de areia calcinada, 17,6% de sedimento manguezal, 25,6% de água de produção e fungos.

O processo de obtenção será explicado a seguir e compreende as etapas de:

- 30 - aquecer a mistura microbiológica a uma temperatura na faixa entre 70 e 90°C sob agitação durante cerca de 3 minutos,
- distribuir a mistura em placas de Petri com tampa,

- semear o fungo *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* ou outros e deixar em repouso,

- aguardar cerca de 90 a 150 dias o aparecimento dos cristais

- adicionar produto clorado para obter a formação da proteína amida.

5

Após um período de 90 dias de semeadura dos fungos, observou-se que se desenvolvia, na parte superficial das amostras, maior proliferação e concentração fúngica, na qual se desenvolveu, acima dos esporos, resíduos e produto cristalizado com brilho, incolor e transparente, de forma quadrada e retangular. A Figura 1 apresenta uma série de fotografias mostrando estas transformações.

10

Na tentativa de identificar tais produtos, foram realizadas análises de Fluorescência de Raios-X, Difractometria de Raios-X, e Infravermelho. Foram empregadas técnicas convencionais de análise, fartamente descritas na literatura e conhecidas dos especialistas na matéria.

15

Identificou-se o cristal halita (NaCl) e compostos orgânicos da estrutura primária, secundária e terciária de uma enzima proteica - Amida, composta pelos aminoácidos cistina, cisteína e pontes de sulfeto, Tiofeno/piridina. Além disso os picos do infravermelho detectaram os metalóides halogenios reativos, supostamente utilizados pelo aminoácido cisteína metalo-protease, em seu processo catalítico de transformação.

20

Este resultado pode ser explicado porquanto a ricina de mamona contém a cisteína, que hidroliza e desidrata o sedimento. Com o passar dos dias o fungo prolifera adaptando seu metabolismo, orgânico e inorgânico, e, em consequência, o sedimento passa a ficar com o pH alterado. Os elementos inorgânicos reagem e produzem o sal de halita (NaCl), entretanto na sua composição agrega outros compostos minerais existentes no manguezal e que são reativos.

25

A Figura 2 apresenta o espectro resultante da análise de infravermelho. Obteve-se um espectro com picos que indicam:

30

- no comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3.600 à 2.700 a absorção de átomos de C-H, O-H e N-H;

- nos picos de comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) de 1.700 à 1630 C=O de amidas e de 1.670 b à 1.630 Amidas N, N-substituídas apresentando uma única banda;

- em 1.400 C-Halogenios , C-Cl, C-Br; em 1.311  $\text{SO}_2$ ;

- 5 - em 1.347 C-O de ácidos carboxílicos; em 1.037 S=O sulfóxido e de 698 à 472 anel aromático, naftaleno e Halogênio C-Cl, C-Br.

O resultado da investigação de análise inorgânica em Fluorescência de Raios-X, é mostrado na Tabela 1.

TABELA 1

1ª Reação		2ª Reação	
Elemento	Concentração (%)	Elemento	Concentração (%)
Cl	8,235	Cl	0,821
S	0,217	S	1,47
Fé	0,139	Cr	0,001
K	0,109	K	0,032
Ca	0,146	Ca	0,016
Ti	0,013	Be	0,001
Br	0,002	Br	0,001
Ga	0,001	Orgânico CHO	97,658
Orgânico CHO	91,238		

10 Como se pode observar foi confirmada a presença de 91,238% de matéria orgânica nos cristais, e ainda, dos elementos metálicos e não-metálicos cloro, enxofre, ferro, potássio, cálcio, titânio, bromo e gálio, na primeira fase. Realizada análise co-variante de dados do tipo Componentes Principais (PCA) se identificando pelos scores e loadings que os minerais enxofre, cloro e cálcio reagem com ferro, cobalto e zirconio inicialmente, e  
15 em uma segunda etapa bromo, rutênio ou mobilidênio.

As proteínas foram identificadas como amidas, formadas pela polimerização de aminoácidos ao serem analisadas por Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

20 Sabe-se que as amidas normalmente não ocorrem na natureza, e são preparadas em laboratório. Comumente são obtidas a partir da desidratação de sais de amônio por meio de aquecimento, sendo largamente utilizadas na



indústria farmacêutica.

Após a mistura microbiológica ter efetuado o processo de biorremediação e com a adição de produtos clorados, por exemplo, o diclorometano, ocorreu reação com muita cristalização

5 O aparecimento do produto transparente e com brilho sobre os cristais evidencia uma transformação significativa. Desta forma, pode-se afirmar que o produto formado na placa sofreu desidratação, formando uma proteína do tipo amida.

10 O produto biológico obtido tem a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito. A interação resulta da alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas, tais como modificação do pH, transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons, que podem ser detectados e medidos por um transdutor.

15 Em outras palavras, isto significa que um determinado analito ou grupo de analitos interagem com o elemento biossensível, produzindo um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração do referido analito, e que pode ser detectado por um transdutor.

20 Foram realizados testes com alguns analitos específicos, os quais são aqui mencionados a título de ilustração e exemplo, mas que não devem ser considerados como restritivos do invento. Ficou comprovada a reatividade a cloro, potássio, bromo, (Tabela 1), diclorometano, entre outros.

25 Conforme descrito na literatura, a reatividade neurotóxica do gás cloro na formação de sais por meio de processo de oxidação, por exemplo, pode ser comprovada com células fotoelétricas. Os experimentos mostraram reatividade do cloreto de sódio em 8%. A ligação protéica de ferro/enxofre (Fe/S-C) pode ser comprovada pela transferência de elétrons.

30 As características acima descritas abrem um leque de possibilidades de aplicação do biossensor obtido de acordo com a presente invenção em diferentes áreas tecnológicas, tais como:

- empregado como catalizador pela eletrólise com célula de membrana, como exemplo não restritivo o cloreto-ferroso ( $\text{FeCl}_2$ );

- pela reatividade do bromo: sendo volátil e denso, reagindo vigorosamente com aminas, alcenos, fenois e hidrocarbonetos, estando seco no cristal, reagindo vigorosamente com titânio e metais alcalinos, sódio e potássio (brometo de potássio);
- 5        - pela incorporação de rutenio na proteína – para uso na indústria eletrônica, em contactos elétricos e em resistências para chips, sendo também bastante requisitado na indústria química, nomeadamente para a produção de elétrodos e catalisadores;
  - na área médica - o cálcio enzimático proporciona atividade nas
  - 10 membranas celulares, dando impulso nervoso celular;
  - na indústria - o samário-cobalto,  $\text{SmCo}_5$  é usado para a produção de ímãs permanentes com resistência à desmagnetização;
  - no desenvolvimento de novos materiais – o elemento gálio, que é um metal mole grisáceo no estado líquido e prateado brilhante ao solidificar,
  - 15 e que funde ao redor em temperatura ambiente.

Torna-se evidente para os especialistas na matéria, que as aplicações citadas não limitam o conceito inventivo aqui apresentado.

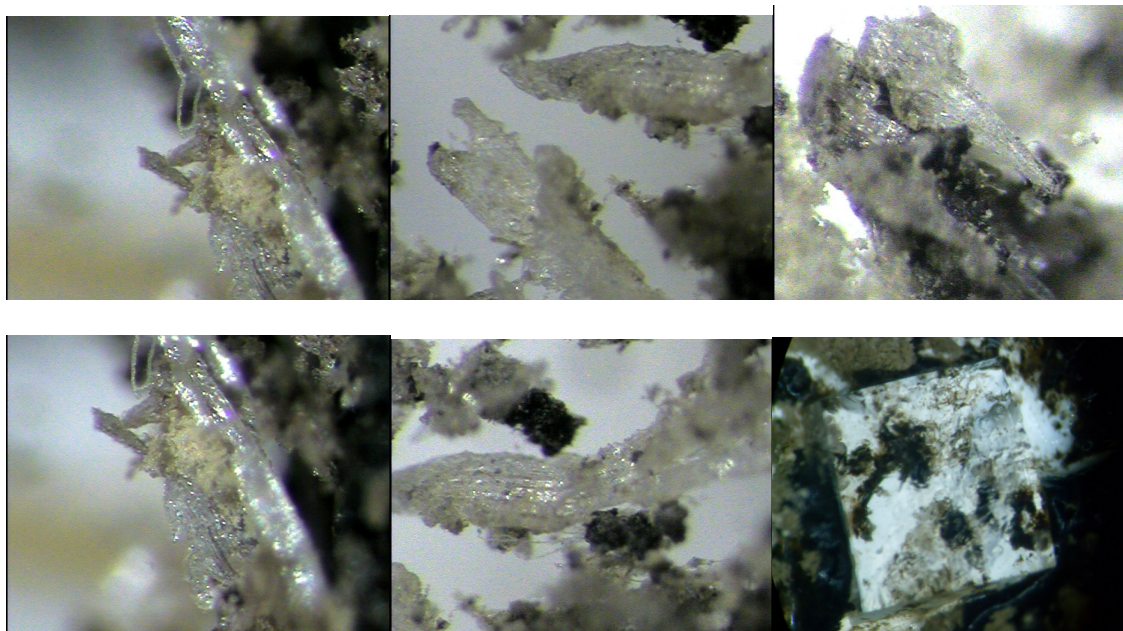


FIG. 1

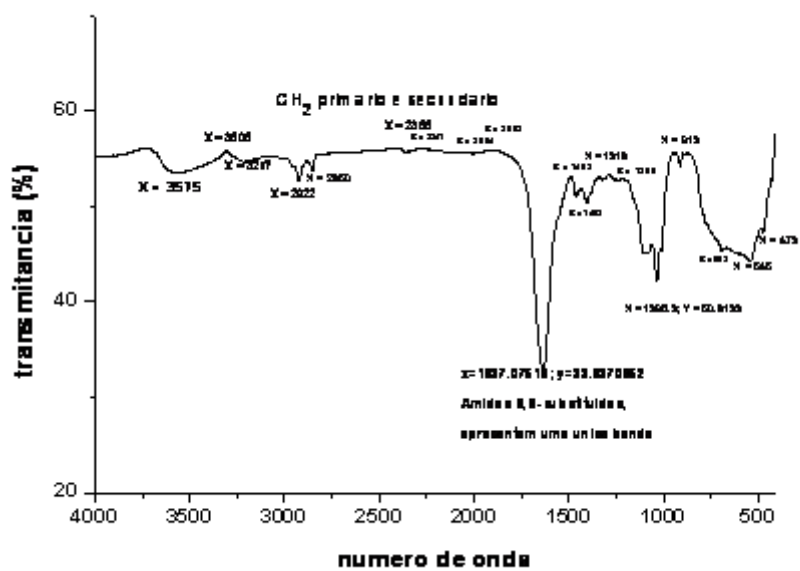


FIG. 2

## REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSSENSORES **caracterizado por** compreender as etapas de: a) preparar uma mistura microbiológica para obter um produto salino cristalizado o qual encerra na sua composição  
5 uma enzima protéica amida obtida a partir da reação de cristalização em meio salino de contaminantes voláteis de manguezais, quando submetidos à processo de biorremediação com fungos *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp ou outros; e b) obter cristais de uma proteína amida composta pelos aminoácidos cistina, cisteína e pontes de sulfeto, Tiofeno/piridina, assim  
10 como metalóides halogenios reativos.
2. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSSENSORES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o produto biológico possuir uma enzima com características eletromagnéticas capaz de produzir um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração de  
15 determinados elementos químicos (analito ou grupo de analitos) quando presentes em uma amostra, os quais interagem com o elemento biossensível, tornando possível sua identificação.
3. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSSENSORES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a mistura microbiológica para a  
20 reação de cristalização apresentar a seguinte composição:
  - a) água de produção – solução salina obtida da indústria de petróleo, na faixa de 20 a 30%;
  - b) glicerina bruta – na faixa de 10 a 15%;
  - c) biomassa residual – torta de mamona (possuindo toxicidade,  
25 devido à presença de ricina, e, aminoácido cisteína), na faixa de 1 a 5%;
  - d) sedimento argiloso de manguezal contaminado com petróleo – na faixa de 15 a 25%;
  - e) areia calcinada - 40 a 50%
  - f) agente biológico massa de 0,001 à 0,05 – cepas do fungo  
30 *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp ou outros.
4. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSSENSORES de acordo

com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- aquecer a mistura microbiológica a uma temperatura na faixa entre 70 e 90°C sob agitação durante cerca de 3 minutos,
- distribuir a mistura em placas de Petri com tampa, ambiente fechado de crescimento de microorganismos como por exemplo.
- semear o fungo *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp e outros e deixar em repouso,
- aguardar cerca de 90 a 150 dias o aparecimento dos cristais
- adicionar produto clorado para obter a formação da proteína amida.

5  
10 5. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSSENSORES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o produto biológico obtido ter a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com um analito, alterando uma ou mais de suas propriedades físico-químicas, tais como modificação do pH, transferência de elétrons, variação de massa, 15 transferência de calor, liberação de gases ou íons.

6. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSSENSORES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o determinado analito ou grupo de analitos interajam com o elemento biossensível, produzindo um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração do referido analito, que pode ser detectado por um transdutor. 20

7. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSSENSORES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** os cristais do produto biológico obtido conter pelo menos 90% de matéria orgânica e elementos metálicos e não-metálicos, tais como cloro, enxofre, ferro, potássio, cálcio, titânio, 25 bromo, gálio.

8. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSSENSORES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o enxofre, cloro e cálcio reagirem com ferro, cobalto e zircônio inicialmente, e em uma segunda etapa, bromo, rutenio ou molibdênio.

30 9. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSSENSORES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o produto biológico obtido apresentar, por meio de processo de oxidação, reatividade neurotóxica do

gás cloro na formação de sais.

10. BIOSSENSORES obtidos de acordo com o processo da reivindicação 1, **caracterizado por** compreender uma proteína amida obtida a partir da reação de cristalização em meio salino de contaminantes voláteis de manguezais, quando submetidos à processo de biorremediação com fungos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp ou outros.
- 5
- 11; BIOSSENSORES obtidos de acordo com o processo da reivindicação 1, **caracterizado por** possuir uma enzima com características eletromagnéticas capaz de produzir um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração de determinados elementos químicos (analito ou grupo de analitos) quando presentes em uma amostra, os quais interagem com o elemento biossensível, tornando possível sua identificação.
- 10
12. BIOSSENSORES obtidos de acordo com o processo da reivindicação 1, **caracterizado por** reconhecer seletivamente e interagir com um analito, alterando uma ou mais de suas propriedades físico-químicas, tais como modificação do pH, transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons.
- 15
13. BIOSSENSORES obtidos de acordo com o processo da reivindicação 1, **caracterizado por** interagirem com um determinado analito ou grupo de analitos produzindo um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração do referido analito, que pode ser detectado por um transdutor.
- 20
14. BIOSSENSORES obtidos de acordo com o processo da reivindicação 1, **caracterizado por** ter aplicação na indústria farmacêutica, medicinal, biotecnológica e eletrônica.
- 25

## RESUMO

### PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE BIOSENSORES E BIOSSENSORES

A presente invenção trata de um processo de obtenção de um produto biossensor e biossensor, o qual é obtido a partir de componentes voláteis encontrados em manguezais contaminados com hidrocarbonetos. O produto biossensor compreende uma proteína amida obtida a partir da reação de cristalização em meio salino de contaminantes voláteis de manguezais, quando submetidos à processo de biorremediação com fungos *Aspergillus* spp, dentre outros. Os produtos obtidos possuem características eletromagnéticas, produzindo um sinal eletrônico proporcional à concentração de determinados elementos presentes em uma amostra.

15

20

25

30

## Apêndice J – Carta Patente de Invenção III

QUINTELLA, M. C.; GONÇALVES, O.; BR PI UFBA Patente; Em sigilo- **Estação de tratamento subterrânea para derrames de petróleo ou esgoto com aplicação de Mistura Microbiológica e método de funcionamento**, 2012.

**ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGOTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO**

10 **Campo da invenção**

A presente invenção trata de uma estação submarina de tratamento de sedimentos contaminados com petróleo, derrames, efluentes residuais marítimos o qual encerra na sua estrutura uma plataforma submarina ou subterrânea brindada ou fechada em concreto com acesso para manutenção, composta de mais três tanques em declive com: Tanque nº1 “espalhamento”, tanque nº2 “reservatório residual”, o tanque nº3 de “captura”.

Mais especificamente a presente invenção trata de uma estação de tratamento que utiliza os co-produtos do biodiesel, glicerina e torta de mamona como bioestímulo para a descontaminação de sedimento manguezal contaminado com petróleo e residuais oleosos sob a influência físico/química e microbiológica o qual permite a transformação de limpeza após tratamento microbiológico por fungos resultando a produção de biopolímeros e cristais protéicos.

A presente invenção trata ainda do processo de biorremediação por fungos, com homogeneização da mistura, espalhamento, volatilização, pressão por queda livre, mineralização e soimbilização dos mineralóides, decantação coleta das soluções aquosas coleta dos orgânicos na formação dos sobrenadantes biopolímeros protéicos e aprisionamento das substancias voláteis, policíclicos aromáticos e hidrocarbonetos em cristais de halita.

**Fundamentos da invenção**

A biorremediação é um processo conduzido pela ação de microorganismos como bactérias e fungos, que utilizam os hidrocarbonetos como nutriente, tornando-se responsáveis pela descontaminação de



ambientes impactados por petróleo.

Acidentes com derramamentos de petróleo afetam as praias, sendo carregado pelas correntes marítimas, chegando aos manguezais, aonde vem a ser letal para uma variedade de formas de vida, como plâncton,  
5 peixes e mariscos, pássaros e mamíferos marinhos.

Com o aumento da produção da indústria petrolífera estes acidentes são mais freqüentes e envolvem cada vez maiores áreas em contaminação por hidrocarbonetos, necessitando assim de medidas tecnológicas de limpeza. Neste cenário a biorremediação se apresenta como uma técnica  
10 vantajosa por ser de baixo custo.

#### TÉCNICA RELACIONADA

A transformação dos hidrocarbonetos pelos microorganismos pode ser facilitada através da produção de enzimas como catalisadores biológicos as quais controlam as reações bioquímicas, produzindo energia e material  
15 necessário para a proliferação de novas células microbianas [UÑA, G. V.; GARCÍA, M. J. N. - Biodegradation of non-ionic dispersants in sea water - **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology** - v. 18, n. 5, p. 315-319, 1983]. Os fungos geram proteases, enzimas protéicas que interagem com o aminoácido cisteína produzida na etapa inicial, liberando  
20 metais de transição, permitindo a propagação da população fúngica.

Os fungos produzem enzimas extracelulares oxidativas, capazes de quebrar compostos policíclicos aromáticos de cadeia longa e transformá-los em compostos assimiláveis ao seu metabolismo. Estas enzimas hidrolisam ligações peptídicas, liberando peptídeos, que são degradados a aminoácidos  
25 livres pelas peptidases [RODWELL, V. W. - Catabolism of Proteins & Amino Acid Nitrogen - **Biomedical Importance**, Japão, n. 28, 2009]. A presença de sais permite que o meio torne-se ácido, o que favorece também o aumento da população da colônia.

A PI1004281-4 A2, de O LUCIANO RODRIGUES DA SILVA (BR/SP)  
30 Processo de tratamento de efluentes em estação modular e dispositivo misturador estático linear com fluxo hidráulico helicoidal, trata de um

processo de tratamento dividido em três partes distintas: 1- processo físico retirada de sólido por peneiramento; 2- biofísico, aeração diminuição da matéria orgânica; 3- físico-químico, aplicação de produto químico para formação de flocos no misturador estático com fluxo hidráulico e posterior retirada no flotor; este processo é eficiente porém utiliza produtos químicos que tornam o processo dispendioso, como também seu produto "formação de flocos" não é reutilizado industrialmente para torná-lo mais acessível.

Diante dos novos desafios da economia petrolífera a invenção agora proposta vem abrir portas para inovações orgânicas da ciência na gestão de negócios com desenvolvimento sustentável no campo e responsabilidade social com emprego e renda. Além disso, visa atender aos desafios tecnológicos ambientais, uma vez que a glicerina bruta e a torta de mamona (*Ricinus communis*), são subprodutos do biodiesel, sendo renováveis e juntamente com fungos anaeróbicos facultativos, elaboram uma fermentação no sedimento argiloso do manguezal.

Ainda se registra aqui que o maior potencial da estação de tratamento é a fabricação em larga escala da produção de Biopolímeros e Cristais Protéicos ambos contendo moléculas encapsuladas de uma proteína Amida.

20

### **Breve descrição das figuras**

A Figura 1 apresenta a estação de tratamento em suas fases de funcionamento, com injeção, espalhamento, queda livre, sedimentação e coleta

25 A Figura 2 apresenta base cabine de comando, maquinário centrífugador com temperatura e saída de injeção.

A Figura 3 apresenta tanque 1, recipiente amplo e aberto com caimento para fosso em declive vertical acentuado, geração de pressão.

30 A Figura 4 apresenta características do fosso vertical, com atenção para base de construção reforçada e superfície aberta com liberação dos voláteis (pequenas moléculas).

A figura 5 apresenta o tanque 2, grande reservatório de sedimentação e separação de fases, sólido/líquido, com vazão líquida e pastosa. Ainda neste tanque uma saída lateral do sedimento biorremediado com programação periódica.

5 A figura 6 apresenta o tanque 3, pequeno coletor de biopolímeros pastoso, residual sobrenadante, com saída para a solução aquosa a ser tratada.

Cada um dos tanques de tratamento com suas específicas contribuições.

## 10 **Sumário da invenção**

A presente invenção trata de uma estação de tratamento interligada com processos físicos, como centrifugação e aumento de temperatura na homogeneização dos componentes da mistura microbiológica. Processo físico no espalhamento e queda livre no fosso, contribuindo para a volatilização e separação residual sólido líquido e gasoso, e na solidificação dos cristais protéicos de halita. Processo microbiológico aumento da proliferação dos fungos pelo uso dos bioestímulos glicerina e torta de mamona encontrada na mistura microbiológica. Processo químico de transformação de novos compostos orgânicos para a sintetização dos biopolímeros protéicos.

20 Mais particularmente a invenção trata de uma estação de tratamento de petróleo, formado por um complexo de tanques, o maquinário base na superfície e cabine de comando mais três tanques dentro de um reservatório submerso ou subterrâneo. Cujo desenvolvimento permite a obtenção de um sobrenadante, biopolímeros protéicos gelatinoso com elasticidade. Ao mesmo tempo em que permite a cristalização de substâncias orgânicas voláteis em cristais de halita oriundas da mistura microbiológica e água salina de produção do meio marítimo.

25 Mais especificamente é um sistema aeróbico e anaeróbico integrado para biorremediação de sedimento contaminado, utilizando uma mistura microbiológica descrito em nossa patente PI UFBA nº 1004444-2 A2, 2010, cujas instruções são incorporadas neste relatório por meio de referência

(QUINTELLA, GONÇALVES, 2010). A mistura microbiológica citada faz uma das partes integrante no processo de transformação microbiológica acelerando as reações físico-químicas com as quais resultam novos processos que produzem produtos específicos. Para tanto após as tomadas  
5 as medidas exatas da formulação, é feita a centrifugação com homogeneização da massa e adicionado os fungos proporcionalmente. Tal mistura é direcionada ao pavimento inferior com possibilidade de grande espalhamento, tornando-se uma massa fina, provocando a primeira evaporação do micro moléculas ou substancias voláteis. Essa massa  
10 condensada em crescente injeção e expansão cai no fosso com alto declive gerando pressão. (Nesta fase se aplica a PI UFBA nº 221109478318, QUINTELLA, GONÇALVES, 2011), a massa microbiológica entra em processo de sedimentação com separação em fases, sólido/líquido, no grande tanque receptor, proporcionando um sobrenadante emulsificado  
15 (biopolímeros) e uma solução aquosa com saída para coleta.

Já pela área externa após período de 90 dias e posteriormente com intervalo, a cada 90 dias serão retirado para coleta as placas engavetadas e que estarão na parte superior/teto do reservatório subterrâneo. Nestas placas se farão a coleta dos cristais protéicos de halita sintetizados pela  
20 condensação/cristalização das reações de substancias voláteis (aqui se aplica a PI UFBA nº 221109478199, QUINTELLA, GONÇALVES, 2011).

25

30

## REIVINDICAÇÕES

1. **ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO**  
5 **caracterizado por** compreender uma estação de tratamento de derrame de petróleo, resíduos petroquímicos, borras oleosas, rejeitos industriais oleosos, lodos de rejeitos de esgotos domésticos e industriais, cujo tratamento será com adição de um MISTURA MICROBIOLÓGICA, UFBA BR n. PI 1004444-2 A2, 2010.
- 10 2. **ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado por** ser flutuante e submersa em área marítima ou subterrânea em área terrestre.
- 15 3. **ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 1 e 2 **caracterizado por** compreender os seguinte níveis de compartimentos:
  - 20     ▪ Plataforma superior de comando ao nível da superfície com anexo do equipamento “acumulação/geração” contendo um agitador/centrifugador para homogeneização dos componentes da mistura quantificada com elevação da temperatura entre 25 à 90°C.
  - 25     ▪ no qual para cada percentual entre 7,25% e 20,50% de resíduo petrolífero será adicionado proporcional a mistura microbiológica, após homogeneizado, com saída de injeção para,
  - 30     ▪ plataforma submarina ou subterrânea brindada ou fechada em concreto com acesso para manutenção, composta de mais três

tanques em declive com: Tanque nº1 “espalhamento”, tanque nº2 “reservatório residual”, o tanque nº3 de “captura”.

- Tela metálica móvel na parte superior da estação de tratamento, funcionando como “gaveta” para retirada periódica de resíduos protéicos cristalizados em cristais de halita.

5

4. **ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo

10

com a reivindicação 3 **caracterizado por** compreender tanque nº1 “espalhamento”, recebe a mistura microbiológica a qual é espalhada abundantemente em área ampla descoberta, no 1º nível, dentro de uma estação de tratamento fechada, possuindo canal de fosso horizontal do qual será redirecionada em grande proporção para um segundo fosso ou canal queda livre em vertical.

15

5. **ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo

20

com a reivindicação 3 e 4 **caracterizado por** compreender um fosso vertical na largura proporcional entre 30 à 90 cm de largura por 30 cm à 1.40 m de altura, em construção resistente como concreto ou inox, com declive proporcional entre 3 à 10 m e espessura entre 10 à 50 cm portanto contendo base, altura e não cobertura; sendo descoberto dentro da estação de tratamento fechada, o que possibilitará a evaporação dos hidrocarbonetos leves voláteis, a serem capturados;

25

6. **ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo

30

com a reivindicação 3, 4 e 5 **caracterizado por** compreender tanque nº 2 “reservatório residual”. Neste tanque a mistura microbiológica

homogeneizada, sob a pressão da queda livre é armazenada e transformada pela ação física/química/microbiológica obtendo os processos de mineralização, separação do material sólido, líquido, gasoso em fases. Conforme a razão injeção/vazão obtém o equilíbrio, e expulsa o sobrenadante e solução aquosa para o tanque nº3.

5

**7. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 3, 4, 5 e 6 **caracterizado por** compreender o tanque nº3 de “captura” do sobrenadante “Biopolímero” da solução aquosa para tratamento. Contendo na altura do  $\frac{1}{2}$  proporcional, duto de saída para solução aquosa com transmissão de fechamento, acima na razão de  $\frac{1}{3}$  canal de saída para a polimerização residual sobrenadante.

10

**8. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 3,4,5,6, e 7 **caracterizado por** compreender na parte superior da estação subterrânea, com “gaveta”na superfície base externa, contendo tela metálica ou outro material resistente com condições de mobilidade periódica.

15

20

**9. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 8 **caracterizado por** possuir após a entrada da mistura microbiológica um compartimento que permite a introdução e coleta de placa móvel, expositora para o interior da estação de tratamento, na qual serão armazenadas os compostos, moléculas voláteis, retidas em cristais de halita da biorremediação, na qual:

25

- 5
- a) a “gaveta” externa terá capacidade e mobilidade de comportar placas móveis, tantas quantas forem necessárias dependendo do tamanho da estação de tratamento,
- b) a “gaveta” externa torna-se a base superior da estação de tratamento, totalmente fechada, submersa com três tanques abertos em funcionamento e com saída líquida e pastosa,
- 10 c) sabendo-se que a cristalização se efetiva após 90 dias e que a quantidade é proporcional ao tempo, (quanto mais tempo maior cristilazação), as telas poderão ser enumeradas e identificadas para um maior controle,
- d) como é um produto orgânico e possui aplicação na indústria farmacêutica e de biotecnologia, a coleta poderá ser mecânica, livre de contaminação.

15 **10. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado por** compreender que a estação de tratamento pode ser edificada em uma balsa “casco de navio flutuante”

20

**11. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado por** compreender a adição de uma mistura microbiológica com os seguintes componentes:

25

- Sedimento argiloso de manguezal contaminado com petróleo – na faixa de 15 a 25%;
  - Areia calcinada – 40 à 50%;
  - Água de produção – solução salina obtida da indústria de petróleo, na faixa de 20 à 30%;
- 30



- Agente biológico massa de 0,001 à 0,05 - cepas de fungos filamentosos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp ou outros;
- Torta de mamona, que contém naturalmente ricina em uma proporção que se encontra na faixa entre 2% p/p e 5% p/p;
- 5       ▪ Posteriormente adicionar glicerina bruta, que pode ser proveniente da produção de biodiesel, em uma proporção que se encontra na faixa entre 10% p/p e 15% p/p.

10       **12. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** caracterizado por utilizar a PI QUINTELLA, C.; GONÇALVES, O., **Processo de obtenção de produto biodegradável para aplicação na remediação de solos, águas e ambientes impactados e**  
15       **método de funcionamento.** BR n. PI 1004444-2 A2, 03 mar. 2010.

20       **13. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- Processador mecânico na superfície com propriedades de quantificação, concentração e agitação dos componentes no processo de formação da mistura microbiológica com a razão proporcional a injeção/vazão, sendo
- 25       ▪ direcionado por espessa tubulação para o tanque nº2, no qual será obtido um imenso espalhamento. Nesta etapa a ação biológica bioprocessa a ricina contida na torta de mamona, gerando novos aminoácidos em geral cisteína, e oxigênio que é bioprocessado para gerar energia química e aumentar a
- 30       eficiência do processo metabólico microbiológico, resultando um material homogêneo em processo de transformação;

- ocorre nesta etapa o crescimento da colônia de fungos na qual:
  - A) os fungos geram proteases, enzimas protéicas que interagem com o aminoácido cisteína produzida na etapa inicial, liberando metais de transição, permitindo a propagação da população fúngica.
  - B) a presença de sais permite que o meio torne-se ácido, o que favorece também o aumento da população da colônia.
  - C) as transformação dos parâmetros físicos, como o pH e Eh, o aumento do pH e a diminuição do Eh, muito baixo cria condições redutivas, e acentua a biorremediação com transformações bioquímicas;
  - D) a presença da glicerina bruta com suas impurezas altera a tensão interfacial, atua na viscosidade e permite que o fungo atue mais intensamente sobre a ricina;
- Esta mistura microbiológica nesta etapa é redirecionada com saída para um canal fosso com queda livre proporcional ao declive de 3 à 13 m. Esta etapa exercendo a gravidade e pressão com caída de impacto no tanque nº2 proporciona a liberação dos hidrocarbonetos leves e substancias voláteis. Este processo reforça as etapas finais, na qual ocorre uma fermentação, dióxido de carbono gasoso que torna o meio mais poroso e permite que os compostos voláteis contaminantes sejam capturados. Com a escassez dos nutrientes fornecidos inicialmente, glicerina e torta de mamona, os microorganismos passam a processar os contaminantes disponíveis no meio preferencialmente para os fungos, os hidrocarbonetos aromáticos.

**14. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 7 **caracterizado por** liberar solução aquosa do

processo de hidrólise, para ser tratada e um biopolímero sobrenadante do tanque nº2 com saída de vazão para o tanque nº3 a ser capturado.

- 5        **15. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 7 e 8 **caracterizado por** o sobrenadante ser um biopolímero gelatinoso protéico contendo a proteína “Amida”  
10        proveniente do processo de hidrólise e captura das substancias ciclisadas e gasosas para a produção de película formada por aminoácidos de microorganismos e vegetais com retenção e aglutinação das partículas de óleo com ampla aplicação na indústria de biotecnologia.
- 15        **16. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado por** utilizar a PI,  
20        UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, Instituto de Química, Quintella, C.M., Gonçalves, O.; **Processo microbiológico para captura de voláteis e produção de biopolímero proteico.** Depósito Patente de Invenção BR/UFBA em 21/10/2011.
- 25        **17. ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado por** utilizar a PI,  
30        UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, Instituto de Química, Goncalves, O., Quintella, C.M., Trigui, J.A., **Processo para obtenção de biossensores e biossensores.** Depósito Patente de Invenção BR/UFBA nº 221109478199 em 21/10/2011.

18. **ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com a reivindicação 1 e 9 **caracterizado por** após aguardar o período de 90 à 150 dias em funcionamento ser obtido cristais de halita (NaCl) com características de compostos orgânicos da estrutura secundária e terciária de enzima protéica – Amida.

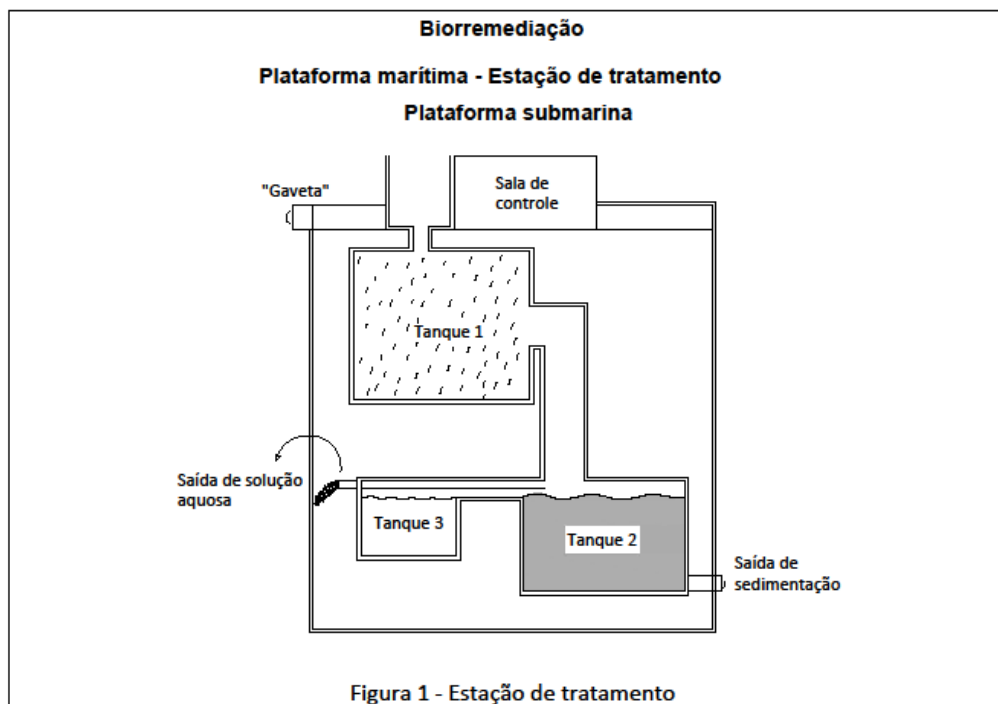
5

19. **ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGÔTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO** de acordo com as reivindicações anteriores é **caracterizado por** possuir no tanque nº3 uma abertura com dispositivo para liberação do residual sólido argiloso, sedimentado e compactado. Tal liberação de sedimento será de acordo com o resultado da razão injeção/vazão, periodicamente.

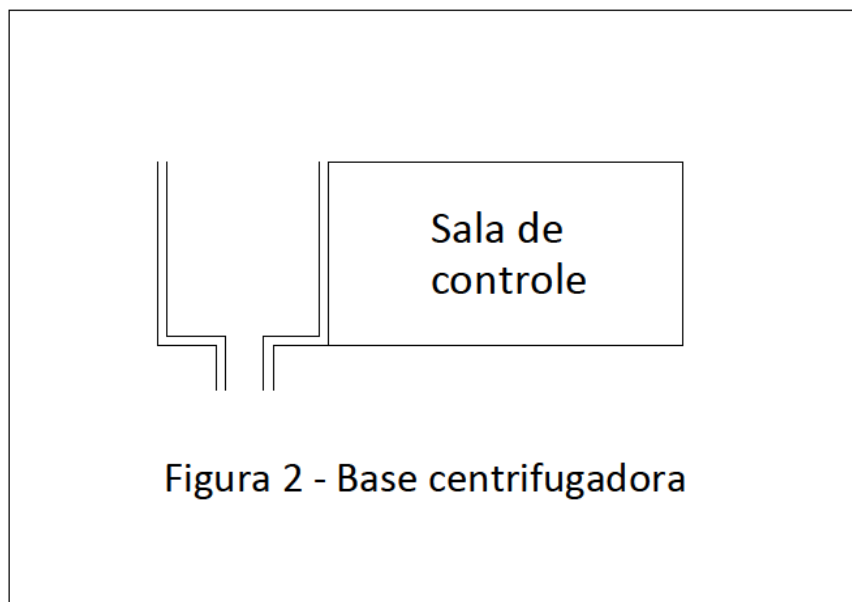
10

15

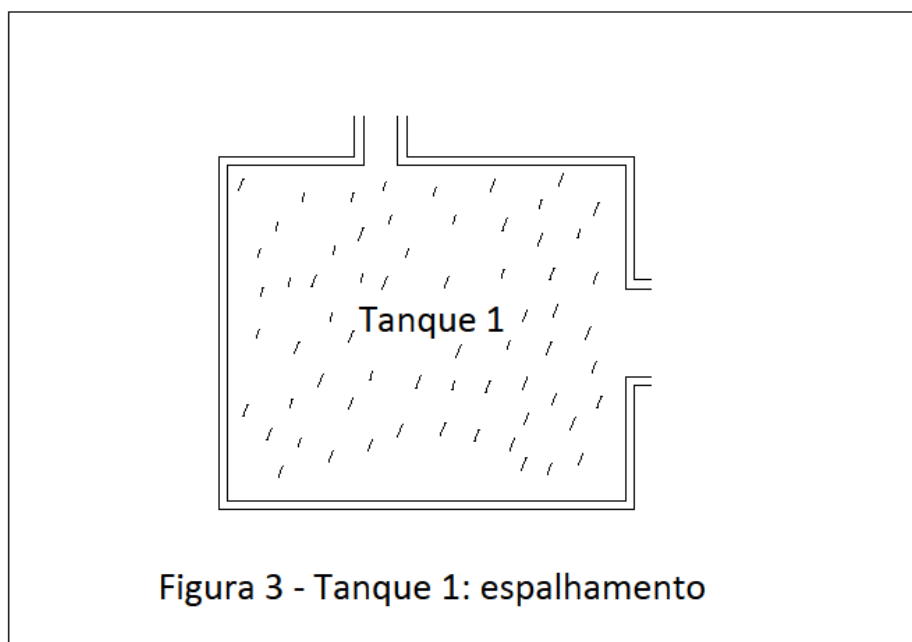
20



**FIGURA1:** Estação de tratamento, figura total



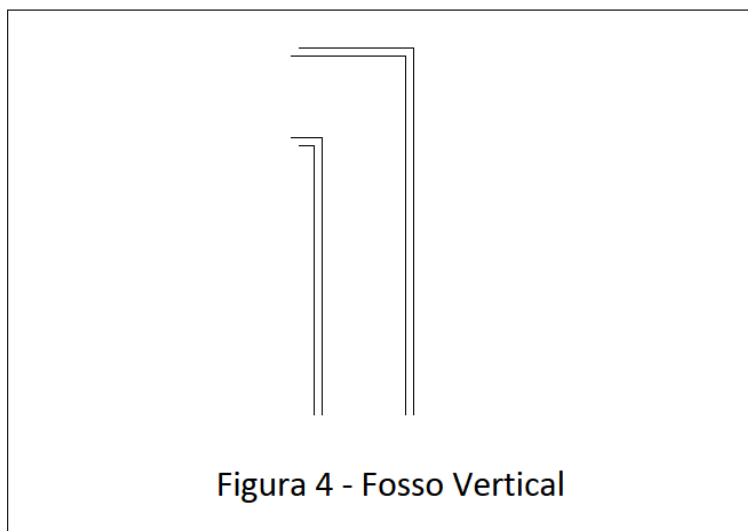
**A Figura 2** apresenta base cabine de comando, maquinário centrifugador com temperatura e saída de injeção.



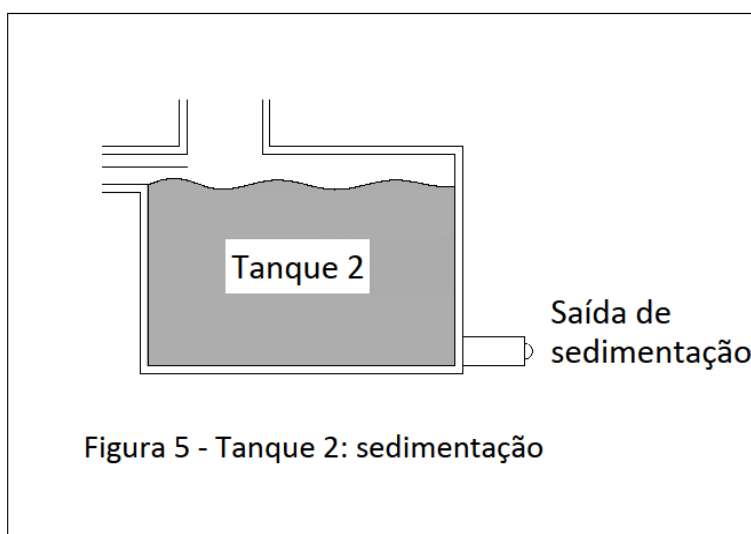
5

**A Figura 3** apresenta tanque 1, recipiente amplo e aberto com

caimento para fosso em declive vertical acentuado, geração de pressão.

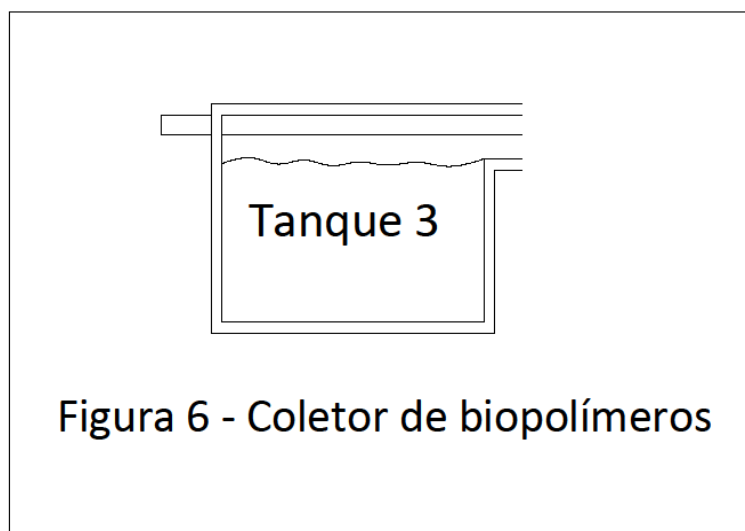


5 **A Figura 4** apresenta características do fosso vertical, com atenção para base de construção reforçada e superfície aberta com liberação dos voláteis (pequenas moléculas).



**A figura 5** apresenta o tanque 2, grande reservatório de sedimentação e separação de fases, sólido/líquido, com vazão líquida e pastosa. Ainda neste tanque uma saída lateral do sedimento biorremediado com programação periódica.

5



**A figura 6** apresenta o tanque 3, pequeno coletor de biopolímeros pastoso, residual sobrenadante, com saída para a solução aquosa a ser tratada.

10

15

20



## RESUMO

### ESTAÇÃO DE TRATAMENTO SUBTERRÂNEA PARA DERRAMES DE PETRÓLEO OU ESGOTO COM APLICAÇÃO DE MISTURA MICROBIOLÓGICA E MÉTODO DE FUNCIONAMENTO

5

A presente invenção refere-se a uma estação subterrânea ou plataforma marítima composta de um tanque na superfície e três tanques introduzidos no seu interior hermeticamente fechado. O tanque de superfície recebe petróleo derramado, rejeito petroquímico, borra oleosa ou de esgoto doméstico, neste é feito a adição dos componentes de uma mistura microbiológica de tratamento, BR n. PI 1004444-2 A2, 03 mar. 2010. O produto é canalizado para o 1º tanque de “espalhamento” e direcionado ao fosso canal de queda livre; deste entra no tanque nº2 “reservatório residual”, onde com a pressão da queda livre armazena a mistura que pela ação físico-química e microbiológica é feita a separação do material sólido, líquido, gasoso em fases. Conforme a razão injeção/vazão obtém o equilíbrio e expulsa para o 3º tanque de “captura” o sobrenadante “Biopolímero” e solução aquosa para tratamento. Tal produto é capturado da ação dos microorganismos e retenção/aglutinação das partículas residuais e de óleo, proveniente dos aminoácidos, microorganismos e vegetais. Além disso, possui um aparador na parte superior interna da estação de tratamento, que funciona como uma gaveta ao ser removido os cristais de halita com as moléculas orgânicas reorganizadas pela condensação e solidificação. Os produtos gerados poderão ser utilizados na indústria de Biotecnologia e Biomédica/Biossensor

10  
15  
20  
25

ANEXO A – Resumo expandido apresentado e aceito para publicação:

## Processo e obtenção de produto biodegradável para biorremediação de áreas impactadas com petróleo com um consórcio de 1ª geração de biocombustíveis.

Odete Gonçalves<sup>1\*</sup> (TC), Cristina M. Quintella<sup>1</sup> (PQ). (Cristina@ufba.br)

**Palavras Chave:** Mamona, Biocombustíveis, Biorremediação, *Aspergillus fumigatus*

### 1 - Introdução

A biorremediação é desenvolvida sob a ação de microorganismos é um método cientificamente comprovado e ecologicamente correto com sustentabilidade. É uma das formas de remediação ocasionada por microorganismos que apresentam capacidade de metabolizar os componentes e transformá-los em substâncias inertes CO<sub>2</sub> e água. Usualmente se utilizam bactérias, sendo que o uso de fungos autóctones ainda é pouco explorado, tendo a vantagem de ser menos agressivo ao ambiente. Aqui se aplica um consórcio de 1ª geração de biocombustíveis, sendo sustentável e renovável com fungos que permitem o processo enzimático da mistura microbiológica: petróleo, água de produção, glicerina bruta e torta de mamona, areia calcinada e fungos. Os meios escolhidos de crescimento ativam e aceleram a cometabolização dos hidrocarbonetos e tem aplicação na remediação de áreas impactadas por petróleo em manguezais e ambientes oleosos.

### 2 - Material e Métodos

Inicialmente foram caracterizados os produtos e substâncias da mistura microbiológica com análises físico-química e técnica de Fluorimetria do petróleo, glicerina bruta, e fungos. Fluorescência de RX em areia calcinada, em toxicologia foi isolado e identificado o fungo *Aspergillus fumigatus*. A mistura microbiológica (Tabela 01) foi composta de resíduo de petróleo 13,25%, areia calcinada 38,46% na 25% Ø ≈48 mesh, água de produção 32,05%, glicerina bruta 12,82% e torta de mamona 3,37%. Foram levados ao aquecedor agitador magnético, na temperatura de 70 até 97°C em agitação constante onde permaneceu por 4 min; após em descanso, foi adicionado cepas do fungo filamentosos *Aspergillus fumigatus*.

**Tabela 01.** Tabela dos produtos e valores em percentagem da mistura microbiológica

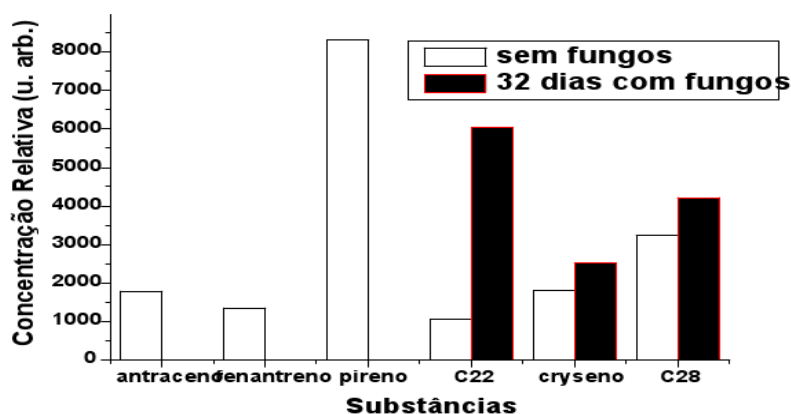
Produtos	Valor %
Resíduo de petróleo	13,25
Torta de mamona	3,37
Glicerina de mamona	12,82
Areia calcinada	38,46
Água de produção	32,05

A mistura foi lacrada e acompanhado o período de incubação com a proliferação dos fungos. Houve um processo de transformação bioquímico e observou-se a liberação de gases.

Foram analisadas alíquotas nos dias zero, 24, 32, 90, 257 e 437 dias, por cromatografia para monitorar a presença de parafinas e por espectrofluorimetria para monitorar os fluoróforos.



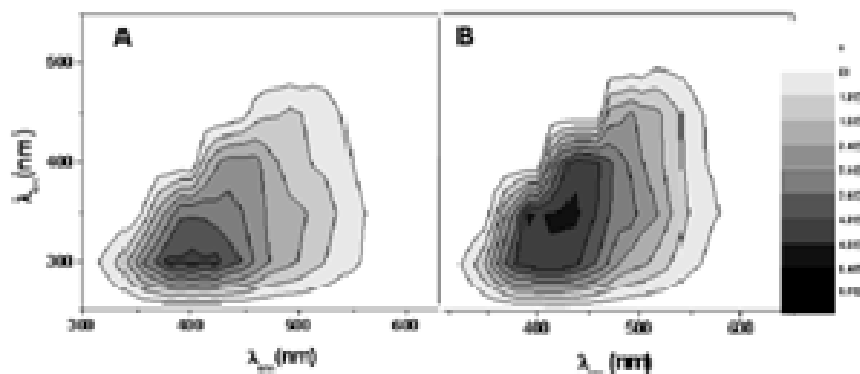
**Figura 1.** Por cromatografia picos de hidrocarbonetos em com aumento da concentração relativa C22, criseneno e C28.



**Fig 1**

Cromatografia técnica de separação de misturas e identificação de seus componentes. Esta depende da diferença entre as interações dos analitos, a fase móvel e a fase estacionária. Foi usado o aparelho espectrofluorímetro Perkin Elmer-LS55. As amostras foram analisadas em cubetas de quartzo de 1cm de secção quadrada. Foi monitorado pico de ativação, crescimento/decaimento no processo microbiológico dos fungos a transformação das substancias (enzimas orgânicas).

**Figura 2:** Mapas espectrofluorimétricos das amostras zero dia e 90 dias.



**Fig 2**

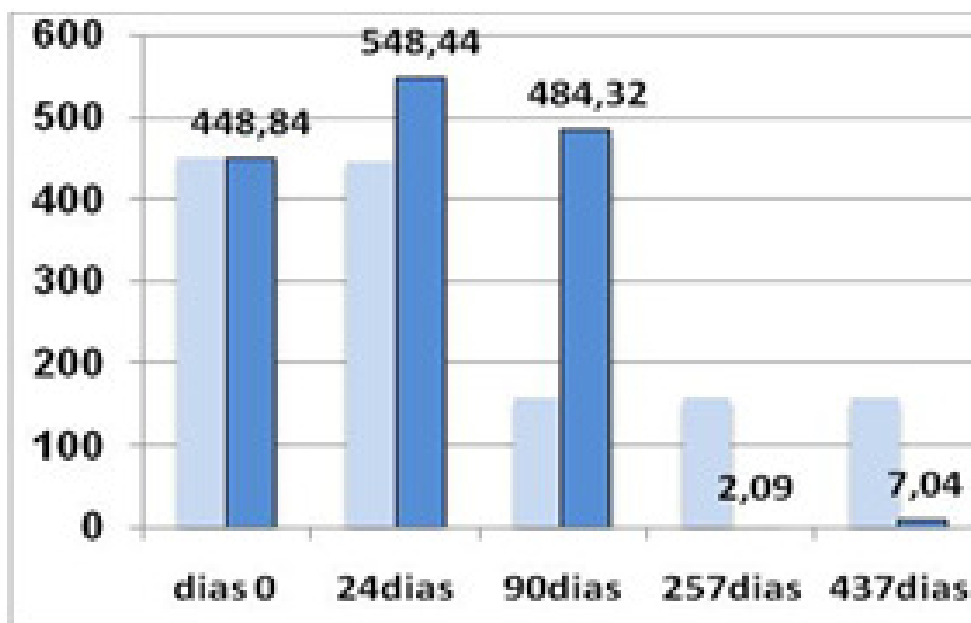
Os resultados foram analisados no programa Origin® com a elaboração de mapas e gráficos de fluorescência molecular. A biorremediação microbiológica se efetiva inicialmente com a proteína vegetal e o fungo e posteriormente com o aumento da população fúngica o consumo de hidrocarbonetos. Adicionalmente, utiliza a proteína vegetal inibidora ricina na fermentação alcoólica como fonte de energia para os fungos modificando a atividade enzimática e favorecendo a mineralização de compostos minerais com os metais de transição como oxido de cádmium provenientes da areia calcinada. A glicerina bruta, co-produto da produção do biodiesel, contém uma mistura de glicerina, ácidos, ésteres, álcalis, e alcoóis, óleo, glicerois, água e sais variados. A presença da glicerina bruta com suas impurezas altera a tensão interfacial, atua na viscosidade e permite que o fungo atue de modo mais intenso sobre a ricina.

### 3 - Resultados e Discussão

A cromatografia mostrou que as amostras do tempo zero sem fungos, a existência de 6 picos atribuídos a antraceno, ferantreno, pireno, C22, criseno, C28. Já no tempo 32 dias, mostrou a ausência dos picos correspondente a antraceno, ferantreno e pireno e o aumento da concentração relativa a C22, criseno e C28 devido a redução da concentração dos demais, identificando o efeito de biorremediação referente a hidrocarbonetos.

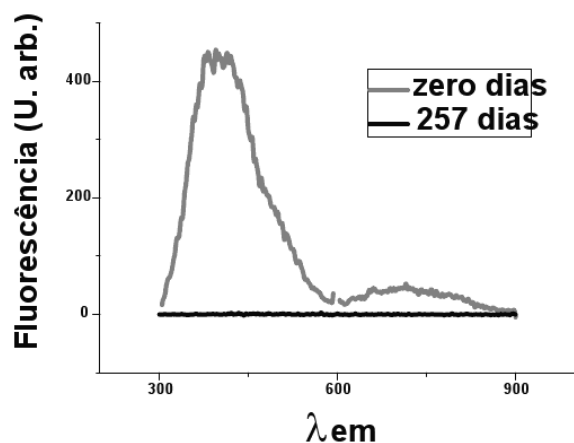
Em fluorescência inicialmente o máximo de excitação em 300nm o que migrou para 390 à 460nm que se explica pelo aumento de concentração relativa de HPAs, devido ao consumo de hidrocarbonetos lineares, após 90 dias a fluorescência reduziu drasticamente pelo consumo dos HPAs

**Figura 3:** Intensidade (u.arb.) de fluorescência induzida excitação 300 nm, para amostras com diferentes tempos de atuação do produto biodegradável.



Em fluorescência inicialmente o máximo de excitação em 300nm o que migrou para 390 à 460nm que se explica pelo aumento de concentração relativa de HPAs, devido ao consumo de hidrocarbonetos lineares, após 90 dias a fluorescência reduziu drasticamente pelo consumo dos HPAs (Figura 4). Assim se efetivou a aplicação do processo de obtenção de um produto biodegradável para emprego em processos de biorremediação de manguezais e áreas impactadas por derrames de petróleo e derivados, o qual é incorporado ao meio contaminado e que se pretende remediar.

**Figura 4:** Fluorescência com excitação a 300 nm, das amostras contaminadas sem ação do produto e com ação do produto por 257 dias



**Fig 4**

Os fungos são capazes de produzir um sistema enzimático responsável pela degradação de compostos xenobióticos. O processo microbiológico aqui proposto envolve o fungo *Aspergillus fumigatus*, com a mamona *Ricinus communis*, sendo uma forma natural e efetiva da natureza resolver seus desequilíbrios através dos seus próprios caminhos como a catálise enzimática, onde extrai seu substrato e faz a organocatálise, em cetonas (compostos cíclicos). Produzem enzimas extracelulares oxidativas, capazes de quebrar compostos de policíclicos aromáticos de cadeia longa em compostos assimiláveis ao seu metabolismo. Na etapa final os nutrientes ficam escassos e a colônia fúngica passa a processar os materiais disponíveis no meio, que são os contaminantes hidrocarbonetos, e ocorre a biorremediação do meio, com liberação de água e de dióxido de carbono. Deste modo foi possível comprovar que com o emprego do produto, em até 32 dias se dá a biorremediação para hidrocarbonetos lineares e que em até 90 dias se dá a biorremediação para HPAs.

#### 4 - Agradecimentos

Laboratório de XRF/ UFBA pelas análises de areias calcinadas, ao Laboratório Análises Toxicológicas IBIO/UFBA pelo isolamento e identificação do fungo, e ao Instituto Politécnica UFBA pela glicerina e torta de mamona. E a Maxidril Equipamentos E&P por conceder resíduo de petróleo.

#### 5 - Bibliografia

<sup>1</sup>BEYNOM, R. J.; BOND, J. S. Proteolytic enzymes: A practical approach. Academic press. Oxford, (eds). **1989**.

<sup>2</sup>Azevedo, W. F. ; & Santos, D. S. (2004). *Acta Crystallogr. Sect. D.-Biol. Crystallogr.* 60, **2003-2005**.

<sup>3</sup>CUNHA, **1996**. *Semina: revista cultural e científica da Universidade Estadual de Londrina*. v. 20-21, pg. 68, Universidade do Texas. **2008**.

<sup>4</sup>UFBA. Instituto de Química (Salvador). Cristina Quintella; Odete Gonçalves. **O Processo de obtenção de produto biodegradável para aplicação na remediação de solos, águas e ambientes impactados e método de funcionamento**. BR n. PI 1004444-2 A2, 03 mar. 2010. Agosto 2011.

ANEXO B – Resumo expandido apresentado e aceito para publicação:

## **BIORREMEDIAÇÃO DE MANGUEZAIS COM CAPTURA DE CONTAMINANTES E PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PROTEICO A PARTIR DE GLICERINA BRUTA E TORTA DE MAMONA**

***Odete Gonçalves (GQ/UFBA, odetegoncalves7@hotmail.com), Cristina M. Quintella (IQ/UFBA, Cristina@ufba.br)***

**Palavras Chave:** Biopolímeros, Fungos, *Ricinus communis*, Manguezal

### **1 - Introdução**

Ecossistemas de manguezal são grandemente sensíveis a distúrbios antrópicos, como a contaminação por petróleo ou por outros produtos tóxicos, que podem causar danos a toda a biota, exercendo impacto por longo prazo

Uma técnica que se mostrou promissora para a recuperação de manguezais contaminados é a biorremediação fungica cujo benefício maior é a mineralização, obtendo como produto final CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pela via aeróbica, assim como formação de biomassa.

Os fungos produzem enzimas extracelulares oxidativas capazes de quebrar compostos policíclicos aromáticos de cadeia longa e transformá-los em compostos assimiláveis ao seu metabolismo. Estas enzimas hidrolisam ligações peptídicas, liberando peptídeos que são degradados a aminoácidos livres pelas peptidases (RODWELL, V. W. 2009).

O crescimento de microrganismos em uma interface de água e óleo favorece o aparecimento de um biofilme, no qual os microrganismos se aderem à superfície de grandes gotas de óleo devido à hidrofobicidade das células, passando a formar uma delgada interface, extraindo os compostos insolúveis em água da fase oleosa e utilizando os sais minerais da fase aquosa. À medida que as células revestem as gotas de óleo produzindo biossurfactantes, reduz-se a tensão interfacial, o que favorece o crescimento e a colonização microbiana (MARTINS, V. G. 2005).

A torta de mamona, oriunda da *Ricinus communis*, é uma fonte de energia para os microrganismos heterotróficos, modificando a atividade enzimática, além de favorecer a soimobilização de compostos minerais e inibir o efeito de algumas toxinas (CAVALCANTI, F. J. A. 1998).

Neste trabalho de pesquisa visou-se a biorremediação de manguezais utilizando os co-produtos do biodiesel torta de mamona e glicerina bruta, e os resíduos terminais do processo de biorremediação capturando e aprisionando os óxidos liberados pelos fungos para a solução salina, transformando-os em um tecido de filme, o qual seco forma uma fina película.

### **2 - Material e Métodos**

O processo de biorremediação foi efetuado em tanques, contendo solução salina e oito tubulações distribuídas no seu interior. As referidas tubulações são dotadas de tela de contenção em sua parte inferior para armazenagem de amostras compostas, retiradas do substrato do manguezal. A mistura microbiológica preparada para o ensaio possuía a seguinte composição: 600 g de substrato manguezal contaminado com petróleo exsudado;

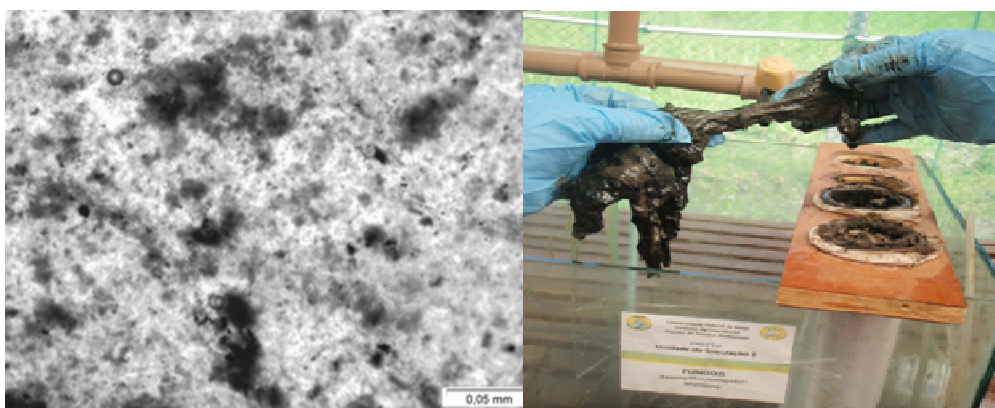
24,60 g glicerina bruta; 34,40 g de torta de mamona; e 50 mL água de produção, mais a adição de cepas do fungo.

Os componentes foram pesados e misturados sob agitação com aquecimento à temperatura na faixa de 85-90°C durante 4 minutos, para solubilizar o petróleo. Em seguida o produto obtido foi colocado nas tubulações e acrescentado o fungo - *Aspergillus spp* ou *Penicillium spp*.

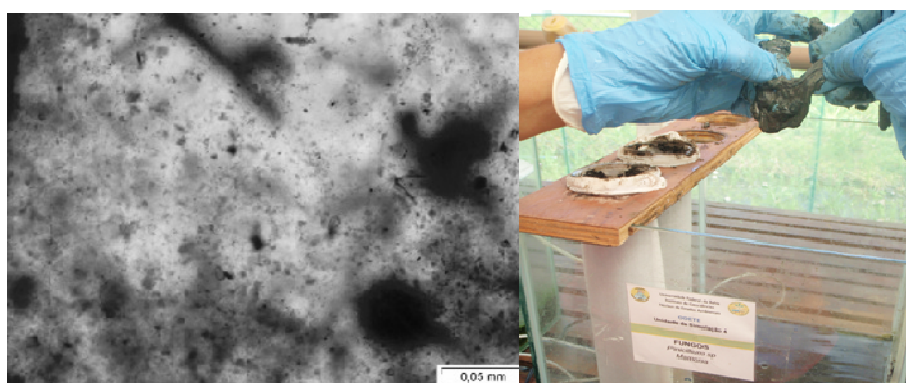
A tela de contenção na parte inferior das tubulações permite a liberação de substâncias com trocas iônicas dentro do tanque contendo a solução salina.

Após quatro dias observou-se a geração de uma camada de emulsão oleosa acima da solução e turvação. Com 20 dias já havia a formação de uma película fina.

**Figura 1.** Apresenta fotografias da película de biopolímero produzido por *Aspergillus spp*.



**Figura 2.** Apresenta fotografias da película de biopolímero produzido por *Penicillium spp*.



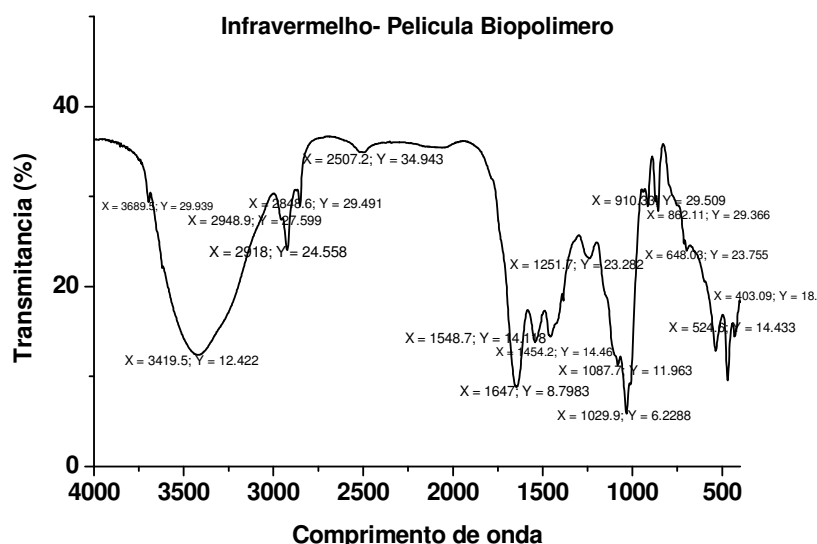
O desenvolvimento de fina película produzida pelos fungos *Aspergillus spp* e *Penicillium spp* foi acompanhado durante o período de oito semanas no sistema experimental de tanques de campo como produto da mistura microbiológica de biorremediação aqui relatada. Foi então feito tratamento de limpeza na membrana com hipoclorito de sódio e diclorometano, sendo depois deixado para evaporação, permitindo, assim, que a película permanecesse seca. Esta amostra foi analisada em Infravermelho para análise orgânica e fluorescência de raios-X para análise inorgânica.



A biorremediação do sedimento contaminado, pela ação dos fungos levou à transformação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em moléculas menores e voláteis, dissolvidas na solução salina, vindo a reagir com a enzima da proteína vegetal ricina da mamona. Finalmente, as substâncias degradadas e os voláteis são capturados para a produção de biopolímero.

Observou-se que a simulação com o fungo *Aspergillus* spp, o biopolímero era mais fino e elástico e com o *Penicillium* spp era menos elástico e com mais impurezas. Este produto membranar possivelmente resulta do processo de hidrólise da cisteína da ricina uma metalo-protease, devido à síntese microbiana de retirar da mistura o oxigênio para sua energia, desidratando o sedimento.

**Figura 3.** Apresenta um espectro de infravermelho, da análise da película seca de biopolímero.



O espectro de infravermelho da película biopolímero seca indicou a presença de enzima protéica tipo amida orgânica com numero de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) cerca de 3.419 associado com aminas secundárias; em comprimento de onda cerca de 2.848, corresponde a amida A; em cerca de 1.647 a C=C vibração aromáticos e  $\text{NO}_2$ ; em cerca de 1.548 a banda forte e a partir cerca de 1.087, são atribuídas a S=O (sulfóxido) e compostos halogênios em alfa

A fluorescência de Raios-X mostrou que 99.8 % do material é orgânico e somente são 0.2 % minerais distribuídos entre enxofre, cálcio, potássio e ferro, resultado este que confirma que consiste numa biopelícula orgânica. Na película formada pelo fungo *Penicillium* spp com a proteína ricina, por seu turno, verificou que 98.88% são constituídas de matéria orgânica e 1.12 % é constituída de minerais distribuídos entre enxofre (0.55%), cálcio, silício, potássio e ferro.

Portanto a biorremediação foi responsável pela produção de dois tipos de biopolímeros compactados, elásticos, produzidos na presença de torta de mamona e glicerina bruta, coproduto do biodiesel, transformando hidrocarboneto policíclicos aromáticos do petróleo, e proteínas vegetais armazenadas como energia nas células dos fungos. Esta película orgânica é formada por um grupo protéico tipo amida com elementos minerais

Estes tecidos microbiológicos são resistentes e gelatinosos, consistindo de filmes membranares, com potenciais aplicações na área biomédica, como por exemplo, em

biotecnologia medicinal focada, ou em revestimentos de dutos e vasos onde deve ser testada a molhabilidade e a reatividade.

**Tabela 1.** Minerais que compõe a película formada pelos *Aspergillus* spp e ricina, análise Fluorescência de Raios-X

Película Membranar Fungo <i>Aspergillus</i> spp		
Nº	Elemento Químico	Quantidade %
1	Enxofre	0.053
2	Cálcio	0.041
3	Potássio	0.041
4	Ferro	0.025
5	Titânio	0.009
6	Bromo	0.007
7	Cromo	0.001
8	Orgânico CHO	99.822
	Total	100%

**Tabela 2.** Película membranar fungo *Penicillium* spp com ricina, análise de inorgânicos, Fluorescência de Raios-X

Película Membranar Fungo <i>Penicillium</i> spp		
Nº	Elemento Químico	Quantidade %
1	Silício	0.553
2	Cálcio	0.39
3	Enxofre	0.068
4	Potássio	0.052
5	Ferro	0.038
6	Titânio	0.009
7	Manganês	0.003
8	CHO (orgânico)	98.886
	TOTAL	100%

Este estudo de processo microbiológico e produto de biopolímeros resultaram em protocolo de depósito de patente de titularidade UFBA no INPI.

#### 4 - Agradecimentos

CNPq pela bolsa de mestrado de O.G.

#### 5 - Bibliografia

- <sup>1</sup>RODWELL, V. W. Catabolism of Proteins & Amino Acid Nitrogen. **Biomedical Importance**, Japão, n. 28, **2009**.
- <sup>2</sup>UFBA. Instituto de Química (Salvador). Cristina Quintella; Odete Gonçalves. **Processo de obtenção de produto biodegradável para aplicação na remediação de solos, águas e ambientes impactados e método de funcionamento**. BR n. PI 1004444-2 A2, 03 mar. 2010, agosto 2011.
- <sup>3</sup>UFBA. Instituto de Química (Salvador). Cristina Quintella; Odete Gonçalves. **Processo Microbiológico para captura de voláteis e produção de biopolímero protéico**. BR Depósito de Patente, 21 out. **2011**.
- <sup>4</sup>UFBA. Instituto de Química (Salvador). Cristina Quintella; Odete Gonçalves; Jorge Alberto Triguis. **Processo para obtenção de biossensores e biossensores**. BR n. PI 221109478199 21 out. 2011.

ANEXO C – Artigo aceito para publicação.

GONÇALVES, O. ; QUINTELLA, C. M.; CERQUEIRA, S. C.; **Prospecção de Microbiologia de Degradação de Áreas Impactadas com Petróleo Ativada por Fungos e Subprodutos do Biodiesel de Mamona**. Cadernos de Prospecção **JCR**, 2012



PROSPECÇÃO DE MICROBIOLOGIA DE DEGRADAÇÃO DE ÁREAS IMPACTADAS COM PETRÓLEO ATIVADOS POR FUNGOS E SUBPRODUTOS DO BIODIESEL DE MAMONA

Odete Gonçalves<sup>1</sup>, Dra. Cristina Maria Quintella<sup>2\*</sup>, Gabriela Silva Cerqueira<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Campus Universitário de Ondina, Avenida Barão de Geremoabo s/n, CEP 40170-290 - Salvador, BA - Brasil  
Telefone: (071) 32836842 Ramal: 3284

RESUMO

A microbiologia de degradação de hidrocarbonetos em áreas impactadas por petróleo constitui um campo de pesquisa em pleno desenvolvimento. Os fungos produzem enzimas extracelulares oxidativas capazes de quebrar compostos de policíclicos aromáticos de cadeia longa, transformá-los em compostos assimiláveis ao metabolismo. A utilização destes no petróleo com adição dos resíduos do biodiesel de mamona é um projeto em desenvolvimento que muito se tem a investigar no campo da biotecnologia. Para conhecimento mais específico foi investigado na literatura científica internacional banco de patentes, Espacenet e no âmbito nacional INPI utilizando palavras chaves. Verificaram-se os maiores índices de depósito na década de 50 destacando-se ano 1950, pelas empresas Shell Int Research e Du Pont, países Estados Unidos e Reino Unido diferenciando-se em relação aos demais. Na Classificação Européia destacou-se a sessão C, Química e Metalurgia, potencializando a química orgânica, corantes tintas e polidores, resinas naturais, Indústrias do Petróleo, gás e do coque.

Palavras Chave: Petróleo, fungo, Mamona, Fluorescência

ABSTRACT

The microbiology of hydrocarbon degradation in areas affected by oil is a search field in full development. The fungi produce extracellular oxidative enzymes able to break compounds polycyclic aromatic long-chain, transforming them into compounds assimilable metabolism. The use of the oil with the residue of biodiesel from castor bean is an ongoing project that has long been investigating the field of biotechnology. For more specific knowledge was investigated in international scientific literature database of patents, Espacenet and national PTO using keywords. There were higher rates of deposit in the 50 years with emphasis on 1950, Shell Int Research companies and Du Pont, countries the United States and United Kingdom in differentiating itself from the rest. In the European Classification stood out Session C, Chemistry and Metallurgy, increasing the organic chemistry, dyes, paints and polishes, natural resins, Industry Oil, gas and coke.

Key words: Petrol, Fung, Castor, Fluoresce

\* [Cristina@ufba.br](mailto:Cristina@ufba.br)

Área tecnológica: Recuperação de petróleo; Tratamento de efluentes e áreas impactadas e água

## **Introdução**

A Agência de Proteção Ambiental estabelece como principais contaminantes do solo, em ordem crescente: cloroalifático, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, cloro aromático, aromáticos simples e outros. Muitos têm sua origem na industrialização do petróleo bruto, outros nas indústrias químicas e atividades agrícolas. No âmbito da biorremediação, os mais visados são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), os hidrocarbonetos halogenados, xenobióticos de grande persistência no solo, e os derivados nitrogenados do nitrotolueno.

A microbiologia de degradação de hidrocarbonetos constitui um campo de pesquisa em pleno desenvolvimento. Tal interesse deve-se ao impacto que estes compostos podem causar no meio ambiente e à crescente utilização de procedimentos microbiológicos de descontaminação de solos, em razão de derramamento acidentais (BONAVENTURA; JOHNSON, 1997).

As contaminações com hidrocarbonetos do petróleo são distúrbios que modificam o ambiente natural e sua capacidade de auto-renovação (QUINTELLA et al., 2009). Neste sentido, vê-se que o benefício maior da aplicação da biorremediação, isto é, aceleração do processo de biodegradação, é a mineralização, obtendo como produto final  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  pela via aeróbica, assim como formação de biomassa, (CUNHA, 1996).

Para Uña e Garcia (1983), a transformação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos pode ser facilitada pela produção de enzimas como catalisadores biológicos que controlam as reações bioquímicas, produzindo energia e material necessário para a proliferação de novas células microbianas.

Os fungos produzem enzimas extracelulares oxidativas capazes de quebrar compostos de policíclicos aromáticos de cadeia longa e transformá-los em compostos assimiláveis ao seu metabolismo. Estas enzimas hidrolisam ligações peptídicas, liberando peptídeos que são degradados a aminoácidos livres pelas peptidases (RODWELL, 2009). Importante salientar, também, que estudos indicam o aumento da biodisponibilidade de policíclicos aromáticos (HPAs), aumento da taxa de solubilização dos metais pesados e aumento de solubilização de naftalenos pelo uso de biossurfactantes (NITSCHKE; PASTORE 2002).

O estudo de fungo no petróleo envolvendo os resíduos do biodiesel de mamona é um projeto de pesquisa ainda em desenvolvimento que muito se tem a investigar no campo da biotecnologia. Para se obter conhecimento mais específico foi investigado na literatura científica internacional de banco de patentes, Espacenet em Worldwide, no âmbito nacional INPI e por Classificação Européia em Códigos de Patentes.

Estes conhecimentos servirão de base para a implantação do experimental que tem por objetivo remediar e solubilizar residual de derrames de petróleo e verificar a transformação após adição de fungos para o processo de biorremediação. Além disso, acompanhar as etapas de desenvolvimento dos fungos na mistura biológica e demonstrar através das análises de fluorescência, a dispersão, transformação e provável recuperação do sedimento. Com esta finalidade de recuperação de áreas com derrames de petróleo, e como desenvolver estudos que possibilite a remediação destes sedimentos, foi implantado na localidade de Madre de Deus, Recôncavo Baiano, um laboratório de campo para desenvolvimento experimental em biorremediação pelo instituto de Geociências onde se têm a oportunidade de realizar práticas experimentais. Neste local pretende-se coletar com testemunhador, sedimento com petróleo exsudado do manguezal para sua caracterização de referencia. Este serão analisados por espectrofluorimetria de fluorescência molecular entre outras análises. Direcionando-se assim

os estudos obtidos nos resultados de tratamento de dados já relacionados na literatura. Para tal caracterização será utilizado o programa estatístico Origin® com produção de mapas de fluorescência o que possibilitará uma melhor avaliação dos dados obtidos.

### **Descrição da Tecnologia**

O estudo de prospecção científica tecnológica aqui descrito compreende uma investigação no banco de dados da Espacenet com documentos de patentes a nível mundial no INPI a nível nacional, contendo informações sobre invenções e desenvolvimento técnico como também, conseqüentemente uma busca mais específica nos bancos de dados por Classificação Européia em Códigos de Patentes. Através do uso da Espacenet pode-se obter acesso direto à EPO com pesquisas de bancos de dados em Alemão, Inglês e Frances. A técnica abrange uma indicação do domínio técnico relacionado com a invenção e descrição detalhada na forma de como foi realizado cada invento e como este pode ser utilizado na aplicação industrial, e quais as indústrias que mais os aplicam. Demonstra uma síntese do estado da técnica anterior suficiente para a compreensão da invenção. É possível usar as respectivas funcionalidades de pesquisa textual, e adequar ordenadamente separando os documentos por partes que se tenha maior interesse em seu conteúdo conforme o objetivo pesquisado.

A espectrofluorimetria é uma técnica que observa a fluorescência molecular geralmente a partir da excitação por comprimentos de onda superiores a 200 nm. Esta é emitida pelo decaimento de um estado energético eletronicamente excitado que é obtido a partir da absorção da radiação eletromagnética pelo estado fundamental. A espectrofluorimetria completa consiste na excitação da amostra num comprimento de onda fixo e na detecção da emissão em todos os comprimentos de onda, sendo o processo repetido mudando apenas o comprimento de onda de excitação.

### **Metodologia ou Escopo**

A metodologia consiste da busca de patentes em bases de dados, por códigos de classificação de campos tecnológicos conforme o objetivo da pesquisa. Este trabalho se desenvolveu buscando os principais dados, em patentes, que possibilitaram informações no campo da pesquisa de derrames de petróleo e áreas impactadas, utilizando os fungos como agente microbiano biorremediador e produtos vegetais como bioestimulante.

Com esta visão foram selecionados os dados utilizando combinação de palavras-chave específicas em buscas no campo dos títulos e resumos. No tratamento dos dados foram excluídas parentes repetidas e famílias de patentes. No entanto para gerar os gráficos foram selecionados países e depositantes com mais de três patentes.

A pesquisa foi realizada utilizando uma combinação de palavras-chave e código de classificação européia como mostra a tabela 1. A sessão que mais se destacou foi a Sessão C, que corresponde a Química e Metalurgia, nesta verificou-se um aumento significativo de número de patentes depositadas como também em subseções como C07, química orgânica, C08, C09 resinas naturais, C10 indústria de petróleo e combustíveis C11 gorduras óleos animais e vegetais. Para um estudo mais abrangente ainda na Classificação Européia foram selecionados os códigos da seção A- Necessidades Humanas, B- Operações de Processamento e D- Têxteis; Papel.

**Tabela 01:** Palavras chave em banco de dados Espacenet

Petrol*	Fun g*	Castor *	Degrad at*	Surfac *	Fluoresc e*	Bioreme d*	Código C	Espacenet
X	x							439
X			X				x	183
X	x		X					13
X	x		X				x	3
X						x		70
X	x					x		3
	x	x				x		0
X	X			X		x		2
X	X	X						29
X				x		x		8
	x					x		38
X		x	X					4
X					X		X	50
		X		X	X			11

**Tabela 02:** Palavras chave em bancos de dados INPI

Degradação	Biocombustível	Fluorescência	Biodegradação	Glicerina	INPI
	X			X	12
	X				11
		X			4
X			X		11
				X	310
			X		45
X					84
	X			X	2

Descrição das seções da Classificação Européia de Patente; Base: Espacenet  
Número: Keyword (s) no Título ou Resumo

#### Seção A – Necessidades Humanas

A – Agricultura; silvicultura; pecuária; caça; captura em armadilh; pesca.  
A61 – Ciência médica ou veterinária; Higiene.

Seção B - Operações de Processamento; Transporte; Separação; Mistura.

### Seção C: Química: Metalurgia

C07 – Química orgânica.

C08 – Compostos; Macromolares orgânicos sua preparação ou seu processamento Químico; Composição baseada nos mesmos.

C09 – Corantes tintas e polidores; RESINAS Naturais; Adesivos composições não abrangentes em outros locais; aplicações de materiais não abrangentes em outros locais.

C10 – Indústria do Petróleo do gás e do coque gases técnicos contendo monóxido de carbono. Combustíveis; lubrificantes; Turfa.

C11 – Óleos animais ou vegetais; gorduras; substancias graxa ou ceras; ácidos graxos derivados dos mesmos detergentes; velas.

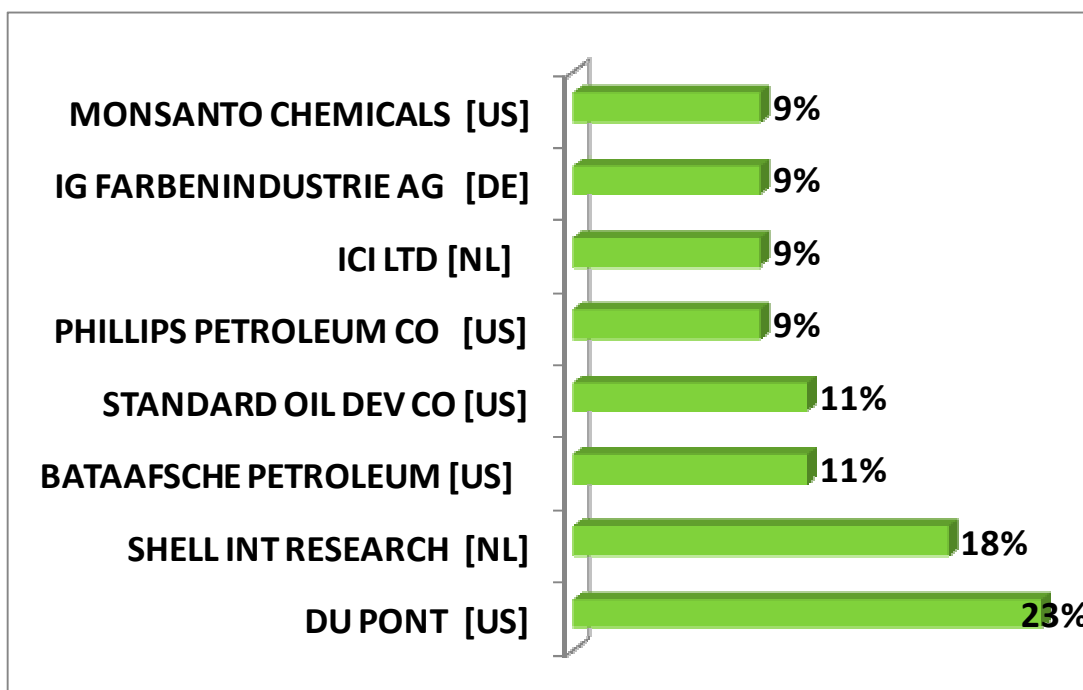
### Seção D - Têxteis; Papel

Têxteis ou Materiais Flexíveis não incluídos em outro local

Fios; Acabamento mecânico de fios ou cordas; Urdidura ou Tecedura; Tecelagem

### Resultados e Discussão

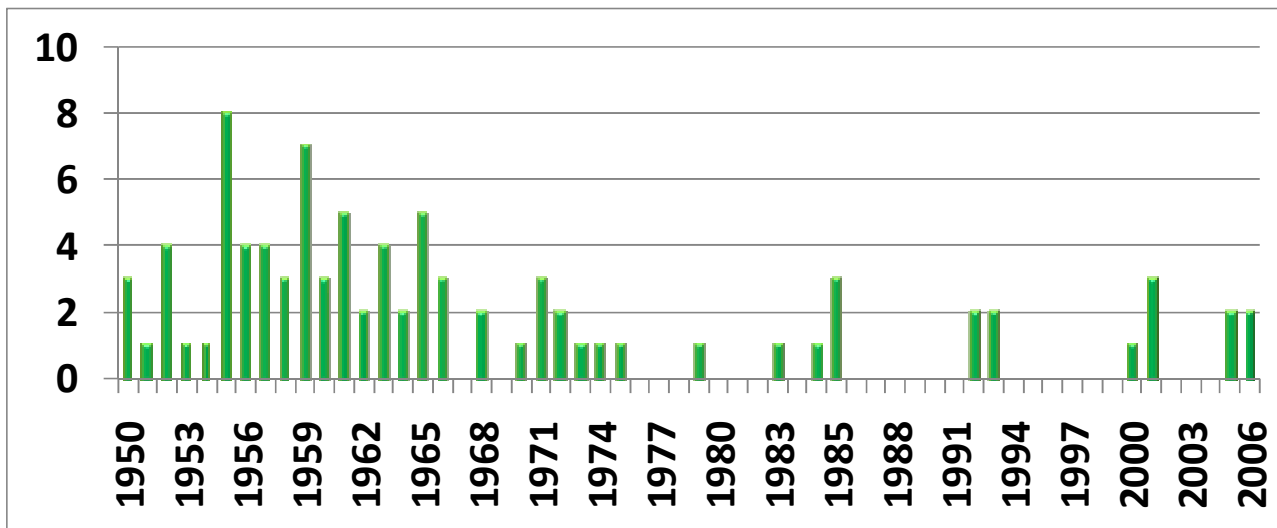
**Figura 1:** Empresas que mais depositaram patentes.



Foram pesquisadas as empresas que se destacaram com mais de 4 patentes. A empresa DU PONT (US) dispara na frente com 23% e a empresa SHELL INT RESEARCH (NL) corresponde a 18%, seguida das empresas STANDARD OIL DEV CO (US) e a

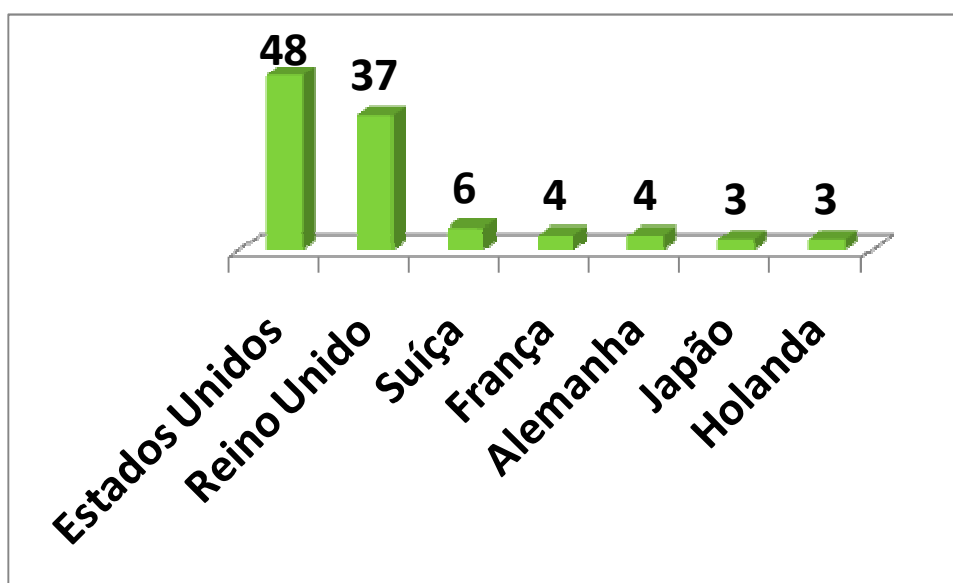
BATAAFSCHE PETROLEUM (US) num índice de 11%, as demais empresas titulares um percentual de 9%.

**Figura 2:** Evolução anual dos depósitos de patentes



A primeira patente foi depositada no ano de 1928 e foram encontradas 21 no período de 1928 a 1950. Na década de 50 destaca-se nos depósitos de patentes o ano de 1955 que apresentou maior pico com 8 patentes. Seguido pelo ano de 1959 com 7 patentes onde se observa em ambos um maior estudo nesta área. Depois destacando-se os anos 1961 e 1965 com 5 patentes. Nos anos mais recentes se observa um declínio no domínio tecnológico o que se torna uma oportunidade com potencial para desenvolver novas invenções da ciência e tecnologia com aplicação no mercado nacional e internacional, na área do petróleo e biosurfactantes de microorganismos.

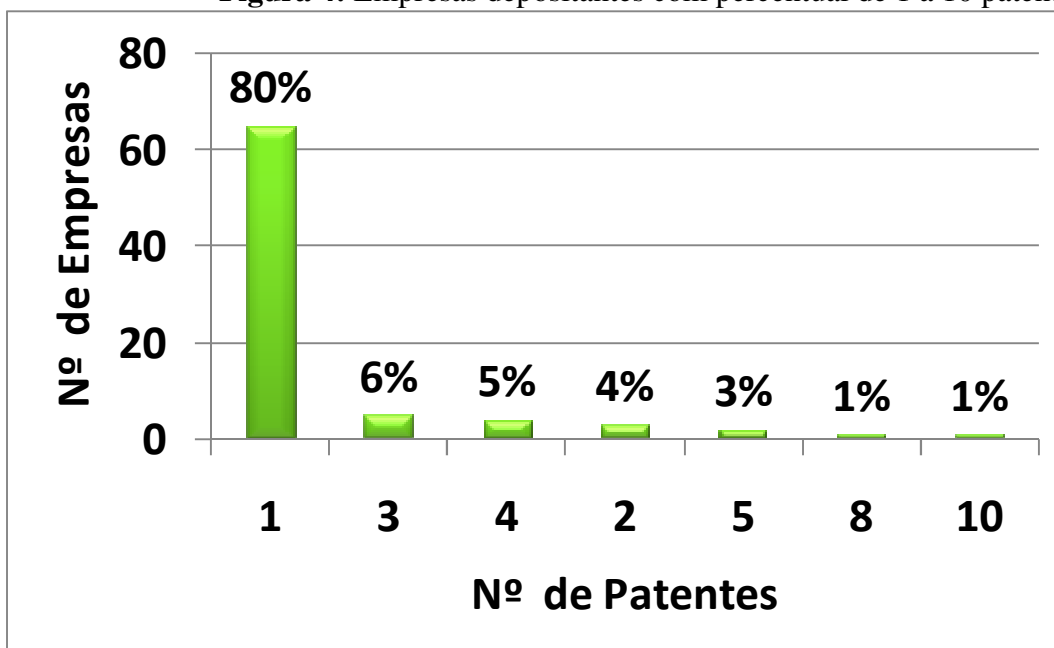
**Figura 3:** Depósito de patentes por países





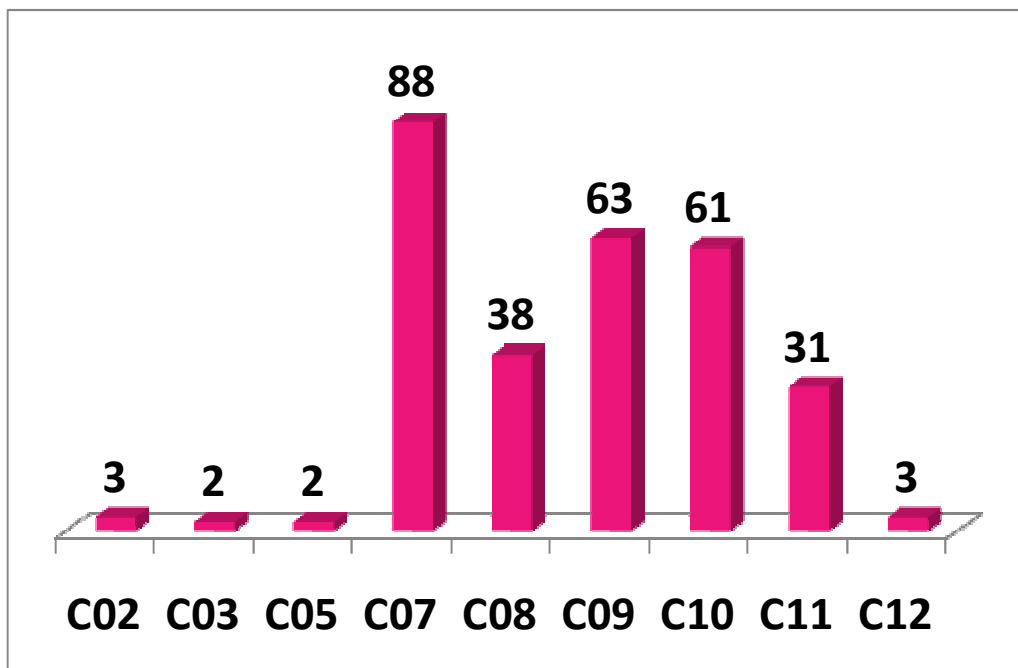
O país que se destaca depositando mais patentes é os Estados Unidos, com 48 patentes, seguido do Reino Unido com 37 patentes. Os demais países como Suíça, França, Alemanha, Japão e Holanda apresentam uma apropriação mais modesta.

**Figura 4:** Empresas depositantes com percentual de 1 a 10 patentes



Verificou-se que 80% das empresas possuem apenas 1 (uma) patente, com 3 patentes tem 6%, com 2 patentes tem 4% , seguida de 4 patentes com percentual de 5% e 5 patentes com 3%, aumentando o número 8 patente em apenas 1% das empresas e finalmente empresas aplicantes com 10 patentes num percentual de 1%.

**Figura 5:** Classificação Europeia por Códigos seção C



A Classificação Européia por códigos na sessão C é a totalidade da prospecção, mais especificamente a sessão C07 de Química Orgânica abrange o maior volume de patentes depositadas com 88 citações, seguida da C09 que trata de Corantes tintas e polidores; Resinas Naturais com 63 citações, logo abaixo a C10 Indústria do Petróleo do gás e do coque gases técnicos contendo monóxido de carbono. Combustíveis; lubrificantes; Turfa, com 61 citações de patentes. As demais são menos expressivas.

Além do código C por Classificação Européia obteve-se também com destaque a sessão B: Operações de Processamento; Transporte. Separação; Mistura, com 24 citações; sessão A61: Necessidades Humanas, Agricultura, com 17 citações; sessão A01 e sessão D1: Têxteis; Papel, ambas com 13 citações.

Como resultado da prospecção científica foi averiguado que com as palavras chaves usadas os maiores índices de depósito de patentes foram nos anos de 1955 e 1959, pelas empresas Shell Int Research e Du Pont, nos países Estados Unidos e Grã-Bretanha com grande destaque em relação aos demais países.

Na Classificação Européia foi feito um estudo mais direcionado na sessão C em Química e Metalurgia, destacando a química orgânica, corantes tintas e polidores, resinas naturais e as indústrias do petróleo do gás e do coque gases tóxicos.

### **Comentários Finais**

Foi possível identificar que os países que mais se destacaram foram os Estados Unidos e o Reino Unido, sendo as principais empresas a estadunidense DU PONT e a holandesa SHELL. Destacando-se a década de 50, como os anos de maior depósito.

Além disso, observa-se que é viável o investimento na pesquisa na área de mamona, fungos e petróleo. Visto que há pouco conhecimento científico e pouco domínio tecnológico. Assim este estudo pode contribuir para identificar novas áreas para o desenvolvimento de tecnologias utilizando processos microbiológicos.

## Perspectivas.

Como perspectiva para estudos mais específicos destaca-se a mamona como um vegetal, que contém substâncias que contribui para a desparafinação do petróleo, e que são utilizadas como substrato para os fungos como *Aspergillus fumigatus*, e estes aceleram a biorremediação dos hidrocarbonetos auxiliados pelos metais de transição.

Como técnica destaca-se a fluorescência molecular com perspectiva de desenvolver bons trabalhos de investigação, principalmente com proteínas biofluorescentes e substâncias orgânicas, estas possibilitam acompanhar o desempenho das reações bioquímicas de transformação das substâncias moleculares.

Como perspectivas nas Biociências fazem-se necessário um estudo específico na área de inibição da formação de cristais inorgânicos pela reação de moléculas orgânicas simples (metalo-enzimas), carbenos quirais com metal. É uma técnica nova, com poucos trabalhos na literatura, mas que abre uma nova perspectiva para as soluções com regeneração própria do meio ambiente e para com as energias renováveis.

## Referências

<sup>1</sup>BONAVENTURA, C.; JOHNSON, F. M. Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 5-20, 1997.

<sup>2</sup>CUNHA, C. D. da. **Avaliação da biodegradação de gasolina em solo**. 1996. 162 f. Dissertação (mestrado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

<sup>3</sup>NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quím. Nova**, Campinas, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

<sup>4</sup>QUINTELLA, C. M. et al. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Quím. Nova**, Campinas, v. 32, n. 3, p. 793-808, 2009.

<sup>5</sup>RODWELL, V. W. Catabolism of proteins & amino acid nitrogen. **Biomedical Importance**. Japão, n. 28, 2009.

<sup>6</sup>UÑA, G. V.; GARCÍA, M. J. N. Biodegradation of non-ionic dispersants in sea water. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 18, n. 5, p. 315-319, 1983.

ANEXO D– Apresentado em Congresso V ENAPID e publicado em revista

## **GLOSSÁRIO DE PROPRIEDADE INTELECTUAL (PI) & TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA (TT)**

*Cristina M. Quintella, Auristela Felix de Oliveira Teodoro, Edijane Matos Sales, Erika Maria de Oliveira Ribeiro, Kenya Felicíssimo, Odete Gonçalves, Raildo Alves Fiuza Junior, Zenira Cardoso Vilasboas Viana*

**RESUMO** - O estudo tem como objetivo apresentar e concatenar um glossário de palavras demonstrando o significado e o emprego específico direcionado de cada vocábulo que internaliza os termos técnicos utilizados pela linguagem da Propriedade Intelectual (PI), Transferência de Tecnologia (TT) e Inovação. Para atingir os objetivos propostos foi realizada uma pesquisa de natureza exploratória, procedendo-se uma investigação bibliográfica e documental. Assim, elaborou-se um quadro no qual consta a lógica conceitual do glossário elucidando os oito grandes grupos que o compõem: fontes; diretrizes, leis e normas; ilegalidade; técnica; instituições; documentação; parcerias e mercado, respeitando-se a natureza e a característica de cada qual e, demonstrando-se que entre eles há uma inter-relação e continuidade, vez que o processo de PI e TT enquanto sistema aberto que se retroalimenta à qualidade, continuidade, desenvolvimento e disseminação. O glossário evidenciado pode ser aplicado à PI, TT diante das demandas sociais, considerando-se a sua abrangência acadêmica e profissional para ampliar os conhecimentos relacionados à apropriação intelectual. Conclui-se que o conhecimento dos termos específicos pode contribuir para o fortalecimento e a continuidade do processo inventivo e inovador que se demonstra corresponsável pelo avanço e o acesso de tecnologias que melhoram a qualidade de vida na Terra.

**PALAVRAS-CHAVE:** Glossário; Propriedade Intelectual; Transferência de Tecnologia.

**ABSTRACT** - The study aims to present and concatenate a glossary of words showing the specific use and meaning of each word directed that internalizes the technical terms used by the language of Intellectual Property (IP), Technology Transfer (TT) and Innovation. To achieve the proposed objectives a survey was conducted exploratory in nature, proceeding to a research literature and documents. Thus, we elaborated a framework in which appears the logical conceptual glossary elucidating the eight major groups that comprise: living source, rules, laws and regulations; illegality; technique; institutions, documentation, and marketing partnerships, respecting the nature and the characteristic of each one, and by demonstrating that among them there is an interrelationship and continuity, since the process of IP and TT as an open system that feeds back to the quality, continuity, development and dissemination. The glossary shown can be applied to IP, TT on social demands, considering its scope to expand academic and professional knowledge related to intellectual appropriation. It is concluded that knowledge of specific terms can contribute to the strengthening and continuity of the inventive and innovative shows that share responsibility for the advancement and access to technologies that improve the quality of life on Earth.

**KEYWORDS:** Glossary; Intellectual Property; Technology Transfer.

## 1. INTRODUÇÃO

O presente estudo tem como objetivo apresentar e concatenar um glossário de palavras demonstrando o significado e o emprego específico direcionado de cada vocábulo que internaliza os termos técnicos utilizados pela linguagem da Propriedade Intelectual (PI), Transferência de Tecnologia (TT) e Inovação. Para atingir os objetivos propostos foi realizada uma pesquisa de natureza exploratória que conforme Gil (1999 apud BEUREN 2006, p.80) “proporciona maior familiaridade com o problema”, e “uma visão geral acerca de determinado fato”. Quanto aos procedimentos esta pesquisa é bibliográfica, pela utilização de fontes secundárias e de acesso público, tais como livros, artigos, periódicos, dicionários e sítios da rede mundial de computadores, e documental através de informações de organizações que são significantes ao objeto investigado. Também, como fonte de embasamento teórico fez-se uso dos acordos de cooperação, manuais, legislações, indicadores em âmbito nacional e internacional. Desta forma se pode construir um glossário aplicado à dinâmica da PI, TT diante das demandas sociais, com os vocábulos distribuídos em 8 (oito) grupos, considerando-se a sua abrangência acadêmica e profissional para ampliar os conhecimentos relacionados à apropriação intelectual. Quanto à abordagem do problema é do tipo qualitativo, vez que foi realizado um estudo subdividindo-se e inter-relacionado os grupos de vocábulos relacionados ao objeto do estudo. Assim, conforme Ponte et al (2010, p.7) “a pesquisa qualitativa analisa pequenas amostras não necessariamente representativas da população, procurando entender as coisas, em vez de mensurá-las.”

O estudo se faz relevante pela importância da temática ao desenvolvimento social, financeiro, econômico, cultural do país e dos poucos estudos acadêmicos relativos à construção de um glossário específico à PI e TT, e que trate da itemização textual e significados concernentes à inovação. Demonstrando-se que há contribuição do glossário à disseminação da PI e TT, posto que a linguagem técnica, precisa estar acessível a todos de maneira a oportunizar o acesso a informação, as novas tecnologias e inventos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

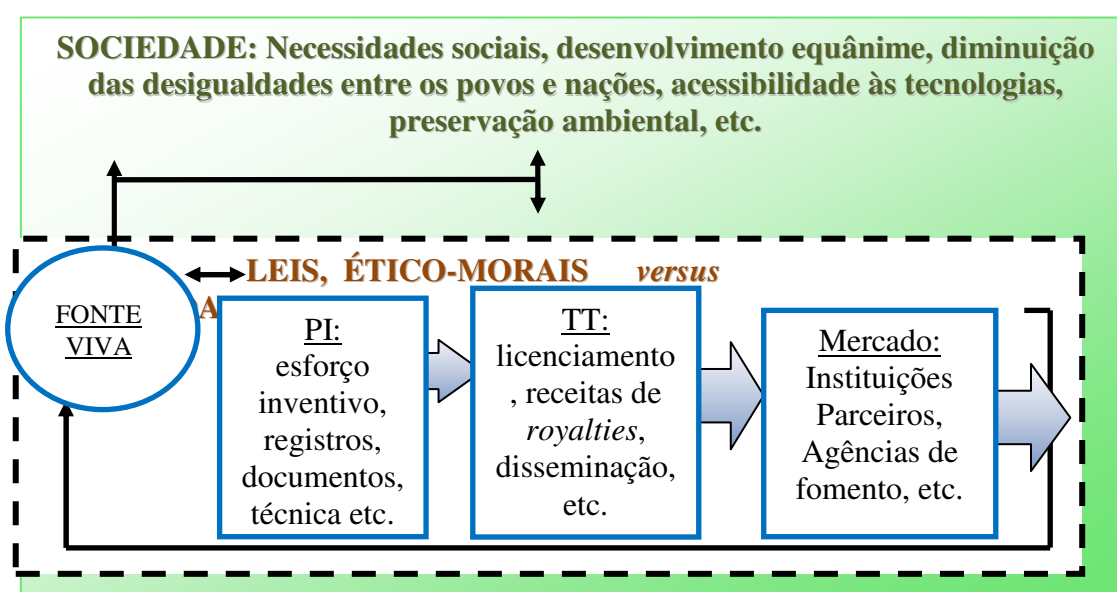
### 2.1 A lógica conceitual do glossário aplicado à PI e TT

Sabe-se que o processo de inovação tecnológica requer investimentos que subsidiem o processo inventivo, conhecimento científico a fim de que se possa ter um construto a partir do intelecto, bem como o reconhecimento do fiel detentor (criador) nos órgãos competentes. Conquanto, muitas vezes não se consegue obter recursos através de fontes de financiamento e parcerias por não se conseguir construir, por exemplo, um projeto que adequado aos editais de agências de fomento, ou, até mesmo, que explicita ao mercado o produto ou processo desenvolvido, inviabilizando o resultado positivo. Também, o registro do processo ou produto carece de uma linguagem específica e adequada para que possa conferir fidedignidade ao processo junto aos órgãos de registro, tal como o INPI no Brasil, de modo a que a reivindicação (no caso de patentes) esteja precisamente concatenada. Desta forma, muitas vezes o registro da patente não é realizado, apesar de ser efetivamente inovador, por exemplo, por inabilidade textual, ou seja, a capacidade de escrita carece de uma linguagem técnica e adequada validando o processo ou produto a ser registrado. (SANTOS, TOLEDO, LOTUFO, 2009).

Neste sentido, o presente estudo evidencia um glossário de termos de maneira a que se possa contribuir para que os processos inerentes à PI e TT, possam ser realizados com maior acurácia e compreensibilidade.

Na figura 1, abaixo, ilustram-se os oito grandes grupos que foram subdivididos no glossário, quais sejam: fontes; diretrizes, leis e normas; ilegalidade; técnica; instituições; documentação; parcerias e mercado. Respeitando-se a natureza e a característica de cada grupo e, demonstrando-se que entre eles há uma inter-relação e continuidade, vez que o processo de PI e TT podem ser apresentados como um enquanto sistema aberto que se retroalimenta a qualidade, continuidade, desenvolvimento e disseminação.

**Figura 1** – Processo de desenvolvimento da propriedade intelectual e transferência de tecnologia face às demandas sociais



Fonte: Elaborado pelos autores, 2012.

A figura conceitual acima demonstra que as leis e as ético-morais opõem à ilegalidade, haja vista que o aparato legal delimita o processo de construção da PI, TT e os ditames mercadológicos. Conquanto o determinado neste texto como fontes, de onde germinam ideias à PI e TT, além de estarem sob a égide do regramento ético-moral e da legalidade estão diretamente relacionados às demandas da sociedade, recebendo e fornecendo informações ao processo PI-TT-Mercado. Ainda, pode-se demonstrar que o sistema aberto integrado pela fontes-PI-TT-Mercado retroalimenta-se tanto pelas fontes quanto pela sociedade. Assim, os ditames, as carências e o interesse da sociedade são os sentidos mais importantes para o desenvolvimento da PI e TT.

## 2.2 Grupos do glossário aplicado à PI e TT

### 2.2.1 Fontes

Neste grupo estarão as bases estimuladoras ao surgimento, crescimento e manutenção da PI ou TT.

**Tabela 1.** Grupo: Fontes

<b>Palavra</b>	<b>Word</b>	<b>Significado</b>
Autor	<i>Author</i>	O que primeiramente realizou uma ação.
Biodiversidade	<i>Biodiversity</i>	Variabilidade entre organismos vivos oriundos de todas as fontes, inclusive os ecossistemas terrestres e marinhos e outros ecossistemas aquáticos, bem como os complexos ecológicos dos quais tais organismos são parte; isso inclui a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas.
Ciência aberta	<i>Open science</i>	Modelo tradicional de pesquisa entre cientistas do mundo todo baseado na livre colaboração e divulgação pública de resultados rápidos, sem restrição de uso. Além de reconhecer a fonte.
Ciência pura	<i>Pure science</i>	Nesta ciência, a preocupação em adquirir novos conhecimentos não está subordinada a objetivos práticos e imediatos. É objetivo o avanço do conhecimento ou a compreensão maior de fenômenos e observações em estudo, sem o propósito de nenhuma aplicação particular e nem de benefícios econômicos ou sociais em longo prazo.
Cultivar	<i>Cultivate</i>	Varietade de planta, com características específicas resultantes de pesquisas em agronomia e biociências (genética, biotecnologia, botânica e ecologia), não simplesmente descoberta na natureza. Há, portanto, necessidade de intervenção humana na alteração da composição genética da planta para a obtenção de vegetal denominado cultivar.
Cultura de inovação	<i>Culture of innovation</i>	O conjunto de crenças, comportamento, processos, valores, formas de agir de uma organização que apoiam a criatividade e a Inovação.
Inovação	<i>Innovation</i>	Implementação de um produto (bens ou serviços) novo ou significativamente melhorado, novo processo, ou novo método de marketing, ou um novo método organizacional nas práticas de negócios, na organização do local de trabalho ou nas relações externas.
Inovação de impacto	<i>Impact of innovation</i>	Inovações que promovem mudanças de paradigmas, ou também chamada de inovação radical.
Inovação induzida	<i>Induced innovation</i>	Inovação com escopo limitado por fatores estratégicos, táticos ou operacionais.
Inovação tecnológica	<i>Technologic innovation</i>	Significa a solução de um problema tecnológico, utilizada pela primeira vez, descrevendo o conjunto

de fases que vão desde a pesquisa básica até o uso prático, compreendendo a introdução de um novo produto no mercado em escala comercial, tendo, em geral, fortes repercussões socioeconômicas.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2012.

### 2.2.2 , Leis e Normas

Neste conjunto estão as normas que fornecem as determinadas em leis preceituadas à PI e TT.

**Tabela 2.** Grupo: , Leis e Normas

Palavra	Word	Significado
Antecipação de publicação	<i>Early publication</i>	Um pedido de antecipação de publicação permite ao requerente encurtar o prazo normal para publicação dos pedidos de direitos de propriedade industrial (6 meses para os modelos de utilidade e desenhos ou modelos e 18 meses para os pedidos de patente).
Backlog de marca	<i>Backlog of trademark</i>	Acúmulo do número de depósito de marcas para análise pelo escritório de propriedade industrial de um país.
Backlog de patentes	<i>Backlog of patents</i>	Acúmulo do número de depósito de patentes para análise pelo escritório de propriedade industrial de um país.
Data de prioridade	<i>Priority date</i>	É a data referente a quem primeiro tiver apresentado pedido regular, a data em que deu entrada ao pedido de patente.
Depósito	<i>Deposit</i>	É o ato de dar início à requisição de um registro de marca ou de uma patente, trata-se do pedido inicial.
Direito de propriedade	<i>Proprietorship</i>	Tipo de direito que a pessoa física ou jurídica tem, dentro dos limites da lei, de ter, usar, gozar e dispor de um bem tangível ou intangível, bem como reivindicá-lo de quem injustamente o detenha.
Direito autoral	<i>Copyright</i>	Proteção legal aos autores de obras literárias (escritas ou orais), audiovisuais, musicais e estéticas (fotografias, pinturas, esculturas etc). Proteção aos direitos conexos, aos direitos de interpretação dos artistas, de produtores de fonogramas e das organizações de radiodifusão. A proteção do direito autoral engloba a proteção aos programas de computador.
Invenções não privilegiáveis	<i>Inventions not patentable</i>	São todas as que não apresentem os requisitos exigidos por lei, como: novidade ou não estão de acordo com os bons costumes.
Licenciamento	<i>Licensing</i>	Permissão de uso, outorgada a um terceiro sobre um direito exclusivo de propriedade intelectual. Cessão de direitos



PCT	<i>Patent Cooperation Treaty</i>	Tratado de Cooperação de Patentes
Período de Graça	<i>Period of grace</i>	De acordo com o art. 12 da Lei brasileira da propriedade industrial, correspondem aos doze meses anteriores ao depósito do pedido de patente de invenção ou modelo de utilidade, ou ainda registro de desenho industrial, nos quais a divulgação da invenção pelo próprio autor, imediata ou mediata, por terceiros, ou ainda pelo próprio INPI, sem autorização do requerente.
Período de Vigência	<i>Validity period</i>	Não será inferior a 5 (cinco) anos para a patente de invenção e a 3 (três) anos para a patente de modelo de utilidade, a contar da data da concessão, ressalvada a hipótese de o INPI estar impedido de proceder ao exame de mérito do pedido, por pendência judicial comprovada ou por motivo de força maior.
Propriedade intelectual	<i>Intellectual property</i>	Conjunto de direitos que compreendem as patentes de invenção, os modelos de utilidade, os desenhos ou modelos industriais, as marcas de fábrica ou de comércio, as marcas de serviço, o nome comercial e as indicações de proveniência ou denominações de origem, bem como a repressão da concorrência desleal.
Trips	<i>Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights</i>	Acordo sobre aspectos dos direitos de propriedade intelectual relacionados ao comércio.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2012.

### 2.2.3 Ilegalidade

Comportamento contrário às , normas, leis, a ética, a moral e os costumes.

**Tabela 3.** Grupo: Ilegalidade

<b>Palavra</b>	<b>Word</b>	<b>Significado</b>
Biopirataria	<i>Biopiracy</i>	Consiste na apropriação indevida de recursos diversos da fauna e flora, levando à monopolização dos conhecimentos das populações tradicionais no que se refere ao uso desses recursos.
Concorrência desleal	<i>Unfair competition</i>	É o crime, previsto na Lei de Propriedade Industrial, que inclui o ato de quem divulga, explora ou utiliza, sem autorização ou por meios ilícitos, informações ou dados confidenciais (segredo de negócio) empregáveis na indústria, comércio ou

		prestação de serviços.
Contrafação de patente	<i>Patent Infringement</i>	Assim se diz para o uso indevido de patente regularmente registrada por outrem, ou seja, a usurpação ao direito do inventor.
Pirataria	<i>Piracy</i>	Em propriedade intelectual, violação ilegal dos direitos autorais. Reprodução não autorizada de materiais protegidos por direitos de propriedade intelectual (como direitos autorais, marcas de fábrica ou de comércio, patentes, indicações geográficas, etc) feitas com fins comerciais e comércio não autorizado de materiais reproduzidos.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2012.

#### 2.2.4 Técnica

Conjunto de ou procedimentos orientados para dirigir uma atividade humana qualquer ou, num sentido mais restrito, o processo científico para realizar uma atividade.

**Tabela 4.** Grupo: Técnica

<b>Palavra</b>	<b>Word</b>	<b>Significado</b>
Anterioridade	<i>Anteriority</i>	É a busca de conhecimento do estado da técnica (qualquer conhecimento disponibilizado ao público antes da data de depósito da patente).
Ativos	<i>Assets</i>	Todos os bens e direitos passíveis de auferir benefícios econômicos futuros e que podem ser controlados pela organização.
Ativos Intangíveis	<i>Intangible assets</i>	Diz-se dos ativos incorpóreos pertencentes à organização, tais como os decorrentes da Propriedade Intelectual.
Ato inventivo	<i>Inventive act</i>	Destina-se a melhorar o uso ou a funcionalidade do objeto por meio de nova forma ou disposição introduzida no objeto ou em seus elementos.
Capital Intelectual	<i>Intellectual capital</i>	Conjunto sistematizado de conhecimentos e sua aplicação.
Classificação Internacional de Patentes	<i>International Patent Classification</i>	É uma classificação especial utilizada internacionalmente para indexação de documentos de patentes de invenção e modelo de utilidade.
Estado da técnica	<i>State of the technique</i>	O estado da técnica é constituído por tudo aquilo tornado acessível ao público antes da data de depósito do pedido de patente, por descrição escrita ou oral, por uso ou qualquer outro meio, no Brasil ou no exterior, ressalvado o disposto no artigos 12, 16 e 17 da LPI.
Estatísticas e indicadores internacionais	<i>Statistics and indicators of international</i>	São oriundas dos órgãos responsáveis pela elaboração de estatísticas e indicadores internacionais de I&D são: OCDE, UNESCO e

s de I&D	<i>R &amp; D</i>	RICYT. Estes organismos preparam manuais metodológicos para outras organizações que servem como diretrizes para elaborar publicações e relatórios de I&D e inovação tecnológica no seu território
Estudo de Futuro	<i>Future study</i>	Termo que abrange todos os tipos de estudos relacionados à tentativa de antecipar ou construir o futuro.
Estudo de viabilidade	<i>Feasibility study</i>	Avaliação dos investimentos (custos operacionais) necessários para a realização de projetos.
Gestão da inovação	<i>Innovation Management</i>	Processo que envolve o gerenciamento de ideias e inovações de uma organização. É tratado de forma sistêmica, englobando estratégia, recursos, governança, modelos organizacionais, processos e ferramentas voltadas para a geração de cultura organizacional propícia à inovação.
Gestão de portfólio de inovação	<i>Technological innovation management</i>	Abordagem que permite, por meio da avaliação e priorização, maximizar os resultados de uma carteira de projetos voltados para inovação.
Melhoria funcional	<i>Functional improvement</i>	Introdução em objeto de uma forma ou disposição que acarrete comodidade ou praticidade ou eficiência à sua utilização e/ou obtenção.
Prospecção tecnológica	<i>Technological prospect</i>	Processo que se ocupa de examinar, sistematicamente, o futuro de longo prazo da ciência, da tecnologia, da economia e da sociedade, com o objetivo de identificar áreas de pesquisa estratégica e tecnologias genéricas emergentes com potencial de gerar os maiores benefícios econômicos e sociais.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2012.

### 2.2.5 Instituições

Neste grupo contam as organizações sejam elas públicas ou privadas, e estas com finalidades lucrativas ou não com foco em PI e TT.

**Tabela 5.** Grupo: Instituições

<b>Palavra</b>	<b>Word</b>	<b>Significado</b>
Empresa incubada	<i>Incubated Company</i>	Empresa instalada dentro de uma incubadora de empresas.
Empresa inovadora	<i>innovative company</i>	Empresa que nasceu a partir de um grupo de pesquisa que pode ter sua origem de empresa, universidade ou centro de pesquisa público ou privado e que possui o foco em inovação.

Escritório de transferência de tecnologia	<i>Office of technology transfer</i>	Organização que promove a interação entre universidades e empresas com o objetivo de prover o setor produtivo de conhecimentos científicos e tecnológicos para o desenvolvimento de inovações.
Incubadora	<i>Incubator</i>	Incubadora é uma instituição de prestação de assistência aos novos empreendimentos.
Núcleo de inovação tecnológica – NIT	<i>Nucleus of technological innovation – NIT</i>	Núcleo ou órgão constituído por uma ou mais ICT com a finalidade de gerir sua política de inovação
Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO-OMPI)	<i>World Intellectual Property Organization (WIPO-WIPO)</i>	É uma das 16 agências especializadas do sistema das Nações Unidas, tem sede na Genebra, Suíça, criada em 1967. É responsável de promover a proteção da propriedade intelectual no mundo todo.
Organização Mundial do Comercio (OMC)	<i>World Trade Organization (WTO)</i>	Organismo internacional encarregado das de intercâmbio entre as nações. Seus três propósitos fundamentais são: ajudar que o comercio flua com a maior liberdade possível, servir de fórum para as negociações comerciais e propiciar a resolução de disputas.
INPI	<i>INPI</i>	Instituto Nacional de Propriedade Industrial: autarquia federal brasileira, criada em 1970 e vinculada ao Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, responsável por registros de marcas, concessão de patentes, averbação de contratos de transferência de tecnologia e de franquia empresarial e por registros de programas de computador, desenho industrial e indicações geográficas em todo o território nacional.
<i>Spin-off / Spin-out</i>	<i>Spin-off / Spin-out</i>	Uma nova empresa criada para comercializar o conhecimento e as habilidades de uma equipe de investigação universitários ou empresariais.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2012.

### 2.2.6 Documentação

Aqui estarão os documentos de PI e TT como um todo e suas partes correlacionadas

**Tabela 6.** Grupo: Documentação

<b>Palavra</b>	<b>Word</b>	<b>Significado</b>
Carta Patente	<i>Letter Patent</i>	Título de propriedade de uma patente registrada, ou concedida (em caráter definitivo). Trata-se do documento legal que atesta o título de propriedade de uma determinada invenção.

Desenho industrial	<i>Industrial design</i>	Trata-se da forma plástica, desenho ou estampa de utilidade meramente estética introduzida em um objeto de patente.
Indicação geográfica	<i>Geographical indication</i>	É o nome dado ao tipo de proteção, no âmbito da propriedade industrial, que se refere a produtos que são originários de uma determinada área geográfica (país, cidade, região ou localidade de seu território) e se tornaram conhecidos por possuírem qualidades ou reputação relacionadas à sua forma de extração, produção ou fabricação. Também refere-se à prestação de determinados serviços.
Marca	<i>Mark / Branding</i>	(a) É o trabalho de construção e gerenciamento de uma marca junto ao mercado. Sua execução é tomada por ações que posicionam e divulgam este ativo no mercado além da sua natureza econômica. Assim, a marca passa a fazer parte da cultura e influencia a vida das pessoas; (b) É todo sinal distintivo, visualmente perceptível, que identifica e distingue produtos e serviços de outros análogos, de procedência diversa, bem como certifica a conformidade dos mesmos com determinadas normas ou especificações técnicas.
Marca Figurativa	<i>Figurative trade mark</i>	Apresenta somente uma figura ou desenho.
Marca Mista	<i>Mixed brand</i>	Combinação de figura e inscrição ou palavra
Modelo de utilidade	<i>Utility model</i>	Nova forma ou disposição introduzida em objeto de uso prático, ou em parte deste, suscetível de aplicação industrial e que envolva ato inventivo, resultando em aperfeiçoamento e melhoria funcional no seu uso ou em sua fabricação. Exemplo: a modificação de forma e estrutura de um aparelho telefônico para integrar o transmissor e o receptor em uma só peça, visando ao seu uso prático.
Patente	<i>Patent</i>	Patente é um título de propriedade temporária sobre uma invenção ou modelo de utilidade, outorgado pelo Estado aos inventores ou outras pessoas físicas ou jurídicas detentoras de direitos sobre a criação.
Patente europeia	<i>European patent</i>	Mecanismo para a proteção dos direitos de propriedade intelectual em vários Estados signatários, com base em uma única aplicação para o Instituto Europeu de Patentes (EPO) - tem o mesmo efeito jurídico que uma patente nacional em cada um dos Estados designados.
Patente requerida	<i>Patent pending</i>	Corresponde a Patente depositada ou Patente pendente, o processo encontra-se em andamento.
Pedido de patente	<i>Patent application</i>	Exerce o direito constitucional de solicitar a concessão do privilégio, presume a apresentação ao INPI de um requerimento; de relatório descritivo; de reivindicações; de desenhos, se a patente o

		comportar; do resumo; e do comprovante do pagamento da retribuição relativa ao depósito.
Registro de desenho industrial	<i>Industrial design registration</i>	Título de propriedade temporária sobre um desenho industrial, outorgado pelo estado aos autores ou outras pessoas físicas ou jurídicas detentoras dos direitos sobre a criação.
Registro de indicação geográfica	<i>Geographical indication registration</i>	É uma forma de agregar valor e credibilidade a um produto ou serviço, conferindo-lhes um diferencial de mercado em função das características de seu local de origem.
Registro de marca	<i>Trade mark registration</i>	Concedido pela legislação brasileira para sinal utilizado em produtos estabelecendo que esses são originários de determinada área geográfica e que possuem qualidades ou reputação relacionadas ao local de origem.
Reivindicação dependente	<i>Dependent claim</i>	É o ato de solicitar um registro de marca; vulgarmente, é o pedido de registro de marca.
Reivindicação independente	<i>Independent claim</i>	Proteção dada ao sinal ou símbolo que identifica um produto ou serviço; podendo ser concedido a uma denominação, uma figura, um logotipo ou emblema, ou, ainda, a uma combinação desses elementos.
Relatório descritivo	<i>Descriptive report</i>	Peça ou parte integrante e obrigatória do pedido de patente.
Suficiência descritiva	<i>Descriptive adequacy</i>	Possuir a invenção ou criação descrição suficiente, perfeitamente clara e completa de modo a permitir sua reprodução por um técnico no assunto.
Transferência de conhecimento	<i>Knowledge transfer</i>	Transferência de conhecimento envolve o processo de captura, recolha e partilha de conhecimento explícito e tácito, incluindo aptidões e competências. Inclui tanto atividades comerciais e não comerciais, tais como colaborações de pesquisa, consultoria, licenciamento, <i>spin-off</i> da criação, mobilidade de investigadores, publicação, etc

Fonte: Elaborado pelos autores, 2012.

### 2.2.7 Parcerias

Importante fonte para implementação, desenvolvimento e disseminação objetivando a qualidade e continuidade, pois que através de acordos lícitos, transparentes e fidedignos implementados entre atores envolvidos em PI e TT.

**Tabela 7.** Grupo: Parcerias

<b>Palavra</b>	<b>Word</b>	<b>Significado</b>
Contrato de confidencialidade	<i>Confidential disclosure agreement</i>	É um contrato assinado entre as partes envolvidas, onde todas concordam em não divulgar informação coberta pelo acordo.

Contrato de parceria	<i>Partner agreement</i>	Instrumento de valor legal que tem o objetivo de formalizar a parceria que visa execução de atividades entre instituições e/ou pessoa física.
Contrato de uso de marca	<i>Trademark use agreement</i>	Objetiva o licenciamento de Uso da Marca registrada ou dos pedidos de registros de marca depositados junto ao INPI. Esses contratos devem respeitar o disposto na Lei da Propriedade Industrial.
Cooperação tecnológica	<i>Technological Cooperation</i>	Instrumento de desenvolvimento que auxilia a promover mudanças estruturais em seus sistemas produtivos, como forma de superar restrições que retardam seu natural crescimento.
Cooperação tecnológica	<i>Techological cooperation</i>	Forma de colaboração entre instituições e/ou pessoa física /empresas, para o desenvolvimento de produtos e processos, este é utilizado quando há contraindicação na efetiva transferência.
Cooperação universidade-empresa	<i>University-enterprise cooperation</i>	Colaboração que pode ter vários objetivos como: formação de recursos humanos, compartilhamento de laboratórios, pesquisa, desenvolvimento tecnológico, transferência de tecnologia e/ou outros.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2012.

### 2.2.8 Mercado

Compõem este grupo palavras que representam o “olhar para fora” do laboratório, das instituições abordando os cenários, os contextos social e econômico no qual a PI e a TT estão inseridos ou poderão estar.

**Tabela 8.** Grupo: Mercado

<b>Palavra</b>	<b>Word</b>	<b>Significado</b>
Acordo de cooperação	<i>Cooperation agreement</i>	Incluem acordos técnicos, financeiros, pesquisas cooperativas ou parcerias, estas consideradas como a forma mais evoluída de cooperação, sem necessariamente ser formalizada uma outra empresa
Benchmarking	<i>Benchmarking</i>	Análise e comparação de dados relativos a diversas dimensões, de forma a identificar as melhores práticas.
Capital de risco corporativo	<i>Corporate venture capital</i>	Investimento de fundos corporativos diretamente em empresas <i>start-up</i> .
Capital semente	<i>Seed capital</i>	Fundos de capital semente investem somas relativamente pequenas em <i>start-ups</i> na fase mais precoce, muitas vezes para financiar estudos de viabilidade e de mercado - muitas universidades e grandes empresas criaram fundos semente dedicada a estimular o <i>spin-off</i> da atividade.

Comercializa- -ção	<i>Commerciali- -sation</i>	Processo pelo qual os resultados de projetos de pesquisa são convertidos em produtos comercializáveis ou serviços seja por inventores ou por terceiros.
Conclaves	<i>Conclaves</i>	Encontro de pessoas detentoras de conhecimento científico, visando inovação.
Difusão tecnológica	<i>Technological diffusion</i>	Processo pelo qual uma inovação estende-se ou se generaliza para diferentes países e regiões e para diferentes indústrias, mercados e firmas.
Empreendedorismo	<i>Entrepreneurship</i>	Utilizado para designar os estudos relativos ao empreendedor, seu perfil, suas origens, seu sistema de atividades, seu universo de atuação.
Ganho econômico	<i>Economic gain</i>	Recebimento de royalties, remunerações e quaisquer benefícios financeiros resultantes da exploração direta ou indireta (licença ou cessão de direito), de uma criação intelectual.
Gastos em inovação	<i>Innovation spending</i>	Investimento financeiro da empresa em atividades relacionadas à inovação.
Receita bruta	<i>Gross revenue</i>	A receita bruta compreende o produto da venda de bens nas operações de conta própria, o preço dos serviços prestados e o resultado auferido nas operações de conta alheia, excluídas as vendas canceladas, as devoluções de vendas, os descontos incondicionais concedidos e os impostos não cumulativos cobrados, destacadamente do comprador ou contratante, e dos quais o vendedor dos bens ou prestador dos serviços seja mero depositário.
Royalties	<i>Royalties</i>	Pagamento do direito de exploração comercial de uma propriedade Intelectual.
Segredo Industrial	<i>Industrial secret</i>	Informação de grande valor que as empresas guardam confidencialmente e que não é do conhecimento geral da indústria correspondente.
Valorar	<i>Valuation</i>	Quantificar financeiramente o valor da tecnologia.
Valorizar	<i>Valorize</i>	Agregar valor a tecnologia.
Vantagem tecnológica	<i>Technological advantage</i>	Capacidade da empresa de se manter na fronteira do conhecimento tecnológico e que favorece o processo de inovação.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2012.

### 3. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o levantamento concatenado de vocábulos apresentados em grupos, subdividindo-se o glossário nas seguintes partes: fontes; técnicas, documentação, leis e normas; ilegalidade; instituições, parcerias, mercado evidenciou que a terminologia específica aplicada ao processo de inovação é um sistema aberto que subsiste aos conclaves sociais.



A propriedade intelectual desenvolve-se quando há transferência de tecnologia à sociedade. Ou seja, quando a sociedade se beneficia do esforço inventivo, que registrado, confere direitos e garantias ao(s) seu(s) inventores. Conquanto, o ciclo de fortalecimento da propriedade intelectual sobressalta-se quando há a retroalimentação, o reinvestimento de um sistema que se fortalece quando há uma inter-relação entre a academia e o mercado, entre as e leis que devem ser respeitadas e quando os conflitos culminam em melhoria científica e da tecnologia que contribui para o desenvolvimento social, econômico, cultural, financeiro-econômico: o desenvolvimento equânime que promove a equidade entre os povos e nações.

Assim, pode-se verificar que o conhecimento dos termos aplicados à PI e TT pode contribuir para o fortalecimento e a continuidade do processo inventivo e inovador que se demonstra corresponsável pelo avanço e o acesso de tecnologias que melhoram a qualidade de vida na Terra.

#### 4. REFERÊNCIAS

AGRONOMIA - Guia do Estudante. Disponível em: <[guiadoestudante.abril.com.br](http://guiadoestudante.abril.com.br)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

ANTROPOLOGIA E NUTRIÇÃO: Um Diálogo Possível – BVS. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <[bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd10\\_01.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd10_01.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

BARBOSA, D. B. **A noção de originalidade e os títulos de obra, em particular, de software**, 2005. Disponível em: < <http://denisbarbosa.addr.com/originalidade.pdf> >. Acesso em: 10 dez. 2011.

BEUREN, Ilse Maria. **Como elaborar trabalhos monográficos em contabilidade: Teoria e prática**. São Paulo: Atlas, 2006.

BOCK, Ana Mercês Bahia et al. **Psicologias: uma introdução ao estudo da psicologia**. 13ª ed. São Paulo: Saraiva, 2001.

BRASIL. Lei n.º 10.973 de 2 de dezembro de 2004. Disponível em:<[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2004/lei/110.973.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/lei/110.973.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

BRASIL. DEL7903. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/1937-1946/Del7903.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/1937-1946/Del7903.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

CONTABILIZAÇÃO DE GANHOS EM PROJETOS DE MELHORIAS. Disponível em: <[br.kaizen.com/.../contabilizacao-de-ganhos-em-projetos-de-melhorias](http://br.kaizen.com/.../contabilizacao-de-ganhos-em-projetos-de-melhorias)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

CONVENÇÃO DE PARIS PARA A PROTEÇÃO DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL – 1967. Decreto nº 5563. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/.../D5563.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/.../D5563.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

GERENCIAMENTO DE RISCOS CORPORATIVOS - Estrutura Integrada. Disponível em: <[www.coso.org/.../COSO\\_ERM\\_ExecutiveSummary\\_Portuguese.pdf](http://www.coso.org/.../COSO_ERM_ExecutiveSummary_Portuguese.pdf)>Formato do arquivo: PDF/Adobe Acrobat>. Acesso em: 10 dez. 2011.

GESTÃO DO CONHECIMENTO. Disponível em: <[www1.serpro.gov.br/publicacoes/gco\\_site/m\\_capitulo01.htm](http://www1.serpro.gov.br/publicacoes/gco_site/m_capitulo01.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

GIL, Antonio Carlos. **Como elaborar projeto de pesquisa**. 3.ed. São Paulo: Atlas, 1999.

MANUAL DE OSLO. Disponível em: <[http://www.conacyt.gob.sv/Indicadores%20Sector%20Academcio/Manual\\_de\\_Oslo%2005.pdf](http://www.conacyt.gob.sv/Indicadores%20Sector%20Academcio/Manual_de_Oslo%2005.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

GLOSSÁRIO - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). Disponível em: <[www.cgee.org.br/prospeccao/index.php?operacao...tto...](http://www.cgee.org.br/prospeccao/index.php?operacao...tto...)> . Acesso em: 10 dez. 2011.

GLOSSÁRIO - Propriedade Intelectual. Disponível em: <[www.propintelectual.com.br/site/index.php?option=com.Q](http://www.propintelectual.com.br/site/index.php?option=com.Q)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

GLOSSÁRIO. Disponível em: <[www.patentnet.com.br/glossario.htm](http://www.patentnet.com.br/glossario.htm)>. Acesso: 10 dez. 2011.

GLOSSARY OF INNOVATION TERMS ARRANGED BY GERMAN EXPERTS. Disponível em: <[http://194.245.126.39/doc/WP1\\_Glossar\\_German\\_Experts\\_1839.pdf](http://194.245.126.39/doc/WP1_Glossar_German_Experts_1839.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

INCUBADORAS DE EMPRESAS — SEBRAE. Disponível em:<[www.sebrae.com.br/customizado/inovacao/.../incubadora-de-empresa..](http://www.sebrae.com.br/customizado/inovacao/.../incubadora-de-empresa..)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. Disponível em:<[www.tecpar.br/appi/Intermediario.../Parte%203\\_7%20-busca1.pd](http://www.tecpar.br/appi/Intermediario.../Parte%203_7%20-busca1.pd)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

INOVAÇÃO DE A A Z – TerraForum. Disponível em: <[inove.terraforum.com.br/Paginas/inovacao.aspx?LID=I](http://inove.terraforum.com.br/Paginas/inovacao.aspx?LID=I)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

MELO, H. S.; LEITÃO, L.C. (org). Dicionário Tecnologia e Inovação. Fortaleza: SEBRAE, 2010.

PONTE, Vera Maria Rodrigues ET AL. Análise das metodologias e técnicas de pesquisas adotadas nos estudos brasileiros sobre *balanced scorecard*: um estudo dos artigos publicados no período de 1999 a 2006. **Anais do I Congresso ANPCONT: A Pesquisa na Evolução das Ciências Contábeis**, Gramado/RS - Brasil, 17 a 19 jun. 2007. Disponível em: < [www.anpcont.com.br/site/docs/congressoI/03/EPC079.pdf](http://www.anpcont.com.br/site/docs/congressoI/03/EPC079.pdf)>. 02 dez. 2010.

SANTOS, Marli Elizabeth Ritter dos; TOLEDO, Patricia Tavares Magalhães de; LOTUFO, Roberto de Alencar (orgs.). **Transferência de Tecnologia: estratégias para a estruturação e gestão de Núcleos de Inovação Tecnológica**. Campinas–SP: Komedi, 2009.

SERVIÇO SOCIAL & REALIDADE. Disponível em:

<[www.franca.unesp.br/ssrealidade/SSR\\_12N1.pdf](http://www.franca.unesp.br/ssrealidade/SSR_12N1.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

SICE - Dicionário de Termos de Comércio - Subsídios, Antidumping. Disponível em: <[www.sice.oas.org/dictionary/SACD\\_p.aspR](http://www.sice.oas.org/dictionary/SACD_p.aspR)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

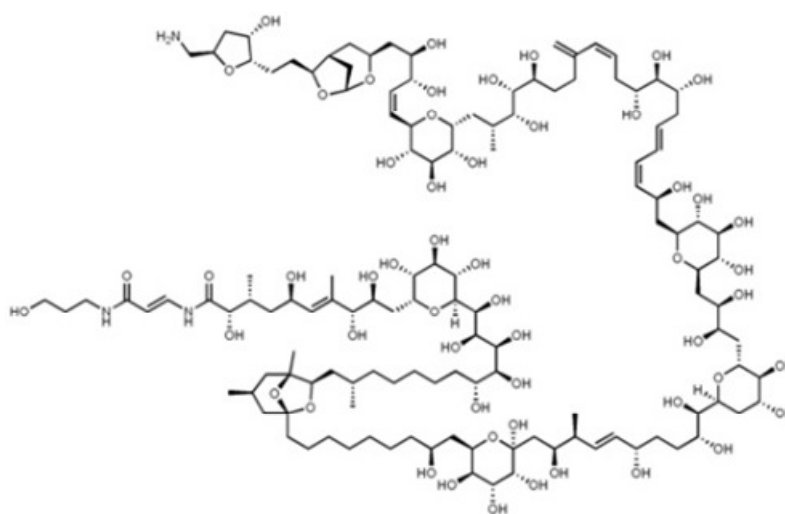
SISTEMA DE MADRI. Publicação OMPI N° 418 (P). Disponível em: <[http://www.wipo.int/freepublications/pt/marks/418/wipo\\_pub\\_418.pdf](http://www.wipo.int/freepublications/pt/marks/418/wipo_pub_418.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2011.

WIPO. Tratado de Cooperação em matéria de Patentes. Disponível em: <<http://www.wipo.int/pct/pt/treaty/about.html>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

## ANEXOS E – Figuras da proteína Ricina e do aminoácido cisteína

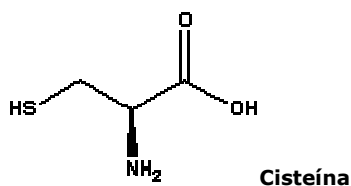
Ainda há a cisteína, outro aminoácido da proteína ricina, uma metalo-protease inibidora, que usa um íon metal no seu mecanismo catalítico e hidrolisa as proteínas (Figuras 37, 38 e 39). Dessa forma, pode-se comprovar que a torta de mamona contém um elevado conteúdo proteico que a torna uma boa matéria-prima para a produção de aminoácidos. Também foi utilizada a água salina, simulando a água do mar e de poços de perfuração de petróleo.

**Figura A** - Estrutura da proteína ricina, presente no vegetal mamona (*Ricinus communis* L.)



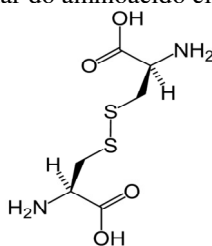
**Fonte:** [http://pt.wikipedia.org/wiki/S%C3%ADntese\\_org%C3%A2nica](http://pt.wikipedia.org/wiki/S%C3%ADntese_org%C3%A2nica)

**Figura B** - Fórmula estrutural do aminoácido cisteína.



**Fonte:** <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/cabelo.html>

**Figura C** - Estrutura molecular do aminoácido cistina, ligando duas cisteínas na presença do enxofre



**Fonte:** <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/cabelo.html>

ANEXOS E: Fotos de coletânea de diferentes etapas do experimental.

Foto de placas de Petri em semeadura, transformações bioquímicas e cristal proteico.  
 Destaque para os nematódeos contribuindo para a biorremediação.

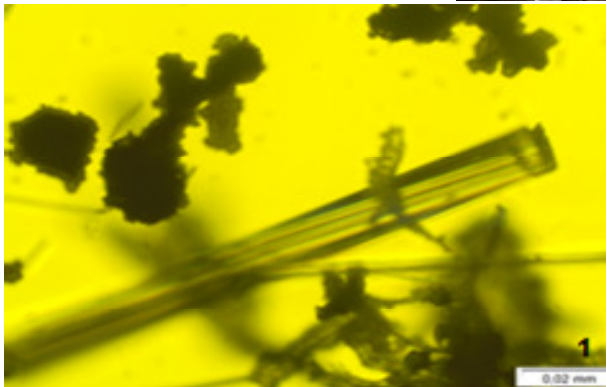
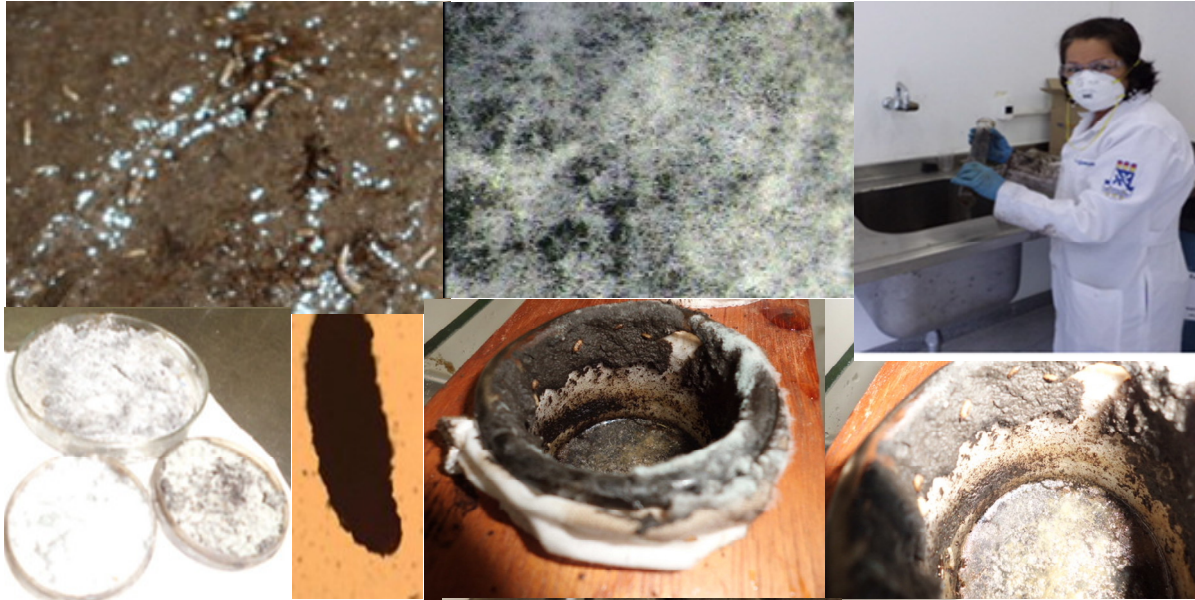
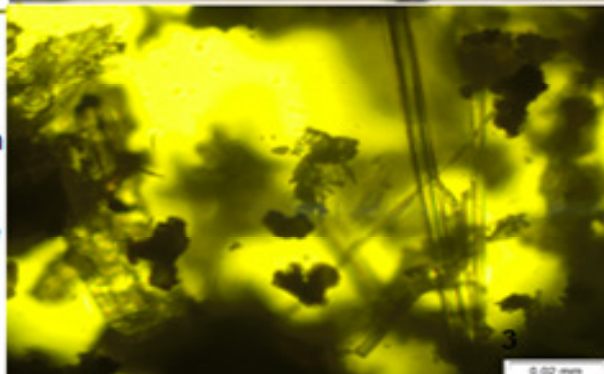


Figura 1: filete cristalizado com imagem de 0,02 mm

Figura 2: residual orgânico cristalizado com imagem de 0,02 mm

Figura 3: filete cristalizado em superfície de mistura microbiológica



ANEXO F: Fotos das diferentes etapas do experimental no campo, coleta, tomada dos parâmetros, aquários, fungo *Aspergillus* spp, biorremediação, equipe de execução.



