UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

# BIODEGRADAÇÃO PARCIAL DE ASFALTENOS POR *Yarrowia lipolytica* COMO ESTRATÉGIA DE AGREGAÇÃO DE VALOR A RESÍDUOS DE PETRÓLEO

**Lívia Cabral Lobo**

Rio de Janeiro
Março de 2012

Lívia Cabral Lobo

# BIODEGRADAÇÃO PARCIAL DE ASFALTENOS POR *Yarrowia lipolytica* COMO ESTRATÉGIA DE AGREGAÇÃO DE VALOR A RESÍDUOS DE PETRÓLEO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós- Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Maria Alice Zarur Coelho D.Sc

Erika Christina Ashton Nunes Chrisman D.Sc

Rio de Janeiro

Março de 2012

# BIODEGRADAÇÃO PARCIAL DE ASFALTENOS POR *Yarrowia lipolytica* COMO ESTRATÉGIA DE AGREGAÇÃO DE VALOR A RESÍDUOS DE PETRÓLEO

*Lívia Cabral Lobo*

Dissertação de Mestrado submetida ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

_____

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc. (orientadora)

_____

Erika Christina A. N. Chrisman, D. Sc. (orientadora)

_____

Andrea Camardella de Lima Rizzo, D. Sc.

_____

Adriana Ururahy Soriano, D. Sc.

_____

Maria José de O. C. Guimarães, D. Sc.

Rio de Janeiro

Março de 2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

Lobo, Lívia Cabral

Biodegradação Parcial de Asfaltenos por *Yarrowia lipolytica* como Estratégia de Agregação de Valor a Resíduos de Petróleo / Lívia Cabral Lobo,

Rio de Janeiro, 2012.

xiv, 82p.

(Dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2012.

Orientadores: Maria Alice Zarur Coelho e Erika Christina A. N. Chrisman

1.Petróleo, 2. Asfalteno, 3. Biodegradação, 4. *Yarrowia lipolytica*, 5. Tese de. (Mestrado – UFRJ/EQ), 6. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc. e Erika Christina Ashton Nunes Chrisman, D.Sc., I. Título.

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação conseguiremos superá-los, independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

**Dalai Lama**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de entrar no mestrado, pela perseverança e sabedoria para permanecer lutando em momentos de grande dificuldade e desânimo e, acima de tudo, agradeço por ter me dado força para conseguir finalizar este trabalho.

Agradeço aos meus pais por todo amor dispensado a mim. Minha mãe Lúzia pela sua fé que me sustentou, por estar sempre disposta a me escutar e por me direcionar com seus conselhos. Pelo meu pai Arnaldo, por ser um paizão em quem eu posso contar a todo o momento, sempre torcendo por todas as minhas conquistas.

Ao meu marido Orlando, por todo amor, dedicação e incentivo, sabendo respeitar os momentos em que precisei ficar sozinha, as noites que passei em claro e as vezes que ele abdicou de fazer algo por minha causa.

Ao meu irmão Rafael, um grande incentivador em tudo o que faço, que com amor sempre se mostrou um amigo em todas as horas.

À minha tia Luiza, minha segunda mãe, pelas suas orações e seu apoiou sem restrições, e pela companhia à UFRJ aos sábados e domingos.

Ao meu cachorro Bud, fiel companheiro, provando ser realmente o melhor amigo do homem.

À família Dopolab (Laboratório de Desenvolvimento e Otimização de Processos Orgânicos): Viviane, Camila, Carlos e Danilo. Com carinho ao Caio e Dudu, por toda ajuda na extração dos asfaltenos, limpeza dos balões, e principalmente, os momentos “terapia” com altas gargalhadas, fazendo do Dopolab um ambiente muito agradável de trabalho. Em especial agradeço a Príscila, mais que uma gerente, uma grande amiga que Deus colocou no meu caminho que se fez presente em todos os momentos bons e ruins.

Aos amigos do Biose (Laboratório de Engenharia de Processos Biológicos): Luana, Patrícia, Aline, Bernardo, Conrado, Diego, Yang, Raisa, Pedro, Nathalia, Camila, Naíra, Luiza, Raquel, Verônica, Fabiana, Beatriz. Em especial as meninas pelos “happy hours” que foram muito importantes para descontrair, relaxando toda tensão, fazendo com que uma amizade fosse construída: Roberta, Fernanda, Roseli, Kelly, Priscilla, Gizele, Marcelle e Mariana. Todas foram de extrema importância, cada uma do seu jeito, me apoiando neste processo. Com carinho à Tatiana, pelo apoio nas nossas conversas profissionais e particulares.

Às minhas orientadoras sou imensamente grata, sem elas jamais teria conseguido finalizar esta etapa. Com toda experiência contribuída para meu crescimento profissional. Erika, como uma mãe, pelo incentivo nos momentos de grande preocupação e estresse. Maria Alice, pelo carinho como me direcionou no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela paciência e confiança!

À todos os meus amigos e familiares que sentiram minha ausência em aniversários e eventos enquanto eu escrevia a "Bíblia". Com carinho especial aos meus amigos Lásaro e Alan, por nossas conversas intermináveis e pelas palavras de estímulo e consolo nos momentos de tristeza, desânimo e solidão.

À professora Leda Castilho, onde toda minha história na UFRJ começou, quem abriu as portas do seu laboratório me dando uma oportunidade no momento em que mais precisei, sem me conhecer.

À professora Claudia Elias Mansur pela atenção dispensada a mim e por permitir o uso do equipamento GPC para minhas análises no IMA. A técnica Dalva por ter realizado minhas análises.

Ao Ricardo do Instituto de Química, agradeço pela disponibilidade em me ajudar, me orientando analiticamente.

Ao Humberto da Quality Lab Brasil, que foi de extrema importância, pois gentilmente cedeu o GC-FID para que eu conseguisse (finalmente) realizar a análise das minhas amostras. Ao técnico Jander, pela atenção, que colaborou de forma expressiva para que eu obtivesse algum resultado plausível, quando nada parecia dar certo.

E a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo da dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc)

# BIODEGRADAÇÃO PARCIAL DE ASFALTENOS POR *Yarrowia lipolytica* COMO ESTRATÉGIA DE AGREGAÇÃO DE VALOR A RESÍDUOS DE PETRÓLEO

*Lívia Cabral Lobo*

A formação de precipitado na indústria de petróleo é um ponto crítico no processo por provocar contaminação dos catalisadores e entupimento dos dutos. Um dos principais compostos responsáveis pela geração e acúmulo deste resíduo de petróleo são os afaltenos. Os asfaltenos são uma fração do petróleo com moléculas altamente complexas, podendo ser classificado de acordo com suas características estruturais, predominantemente modelo arquipélago ou modelo continental. Nas refinarias, o asfalteno é considerado um interferente indesejado devido suas propriedades físico-químicas. Portanto, esse trabalho teve como objetivo degradar parcialmente o asfalteno em um produto economicamente viável, agregando valor a um resíduo de processo. A degradação microbiana foi considerada a técnica mais prudente mediante a viabilidade de degradar o produto de forma parcial e não total, além de ser uma técnica menos agressiva. Neste caso, *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 mostrou ser um micro-organismo com potencial para aplicação como biocatalisadora por ter afinidade com substratos hidrofóbicos, podendo consumir hidrocarbonetos. Durante o procedimento foi descrito um planejamento experimental onde foram avaliados agitação, concentração do inóculo e quantidade de asfalteno. As amostras foram analisadas primeiramente em cromatógrafo de permeação em gel, e ao final, por cromatógrafo gasoso por detecção de ionização de chamas. Os gráficos do cromatograma mostraram alterações entre o asfalteno bruto e o asfalteno após processo de biodegradação. Além de comprovar que o asfalteno modelo arquipélago apresentou respostas significativamente diferentes do modelo continental. Contudo, concluiu-se que os resultados obtidos confirmam a viabilidade de *Y. lipolytica* atuar como biocatalisadora na degradação de asfaltenos, necessitando de estudos mais aprofundados.

Abstract of a dissertation presented to course of Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - EQ/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science

**PARTIAL BIODEGRADATION OF ASPHALTENE BY *Yarrowia lipolytica* AS A STRATEGY FOR ADD VALUE OF A WASTE OIL**

*Lívia Cabral Lobo*

The formation of precipitate in the petroleum industry is a critical point in the process to cause contamination of catalysts and obstruction of the ducts. One of the main compound responsible for the generation and accumulation of crude oil residue are the asphaltenes. The asphaltenes are a fraction of petroleum with highly complex molecules, which can be classified according to their structural characteristics, predominantly continental model or archipelago model. In refineries, asphaltene is considered an unwanted interference due to its physico-chemical properties. Therefore, this study aimed to partially convert asphaltenes in an economically viable product, adding value to a process residue. Microbial degradation was considered as the most prudent means to degrade the viability of the product of a partial and not total, as well as being a less aggressive. In this case, *Yarrowia lipolyitca* IMUFRJ 50682 proved to be a microorganism with potential for application like biocatalyst with affinity for hydrophobic substrates and can consume hydrocarbons. During the procedure was described an experimental design were evaluated agitation, inoculum concentration and amount of asphaltene. The samples were analysed first time in gel permeation chromatograph, and finally, by gas chromatograph by flame ionization detection. The graphics of the chromatogram showed changes between the crude asphaltene and asphaltene after biodegradation process. In addition to prove that the archipelago asphaltene model showed significantly different responses of the continental model. However, it was concluded that the results confirm the feasibility of *Y. lipolytica* act as biocatalyst in the degradation of asphaltenes, requiring further study.

## SUMÁRIO

**Capítulo 1 – Introdução.....15**

**Capítulo 2 – Objetivos.....17**

**Capítulo 3 – Revisão Bibliográfica.....18**

3.1. Petróleo.....18

3.1.1. Constituintes do Petróleo.....19

3.1.2. Refino do Petróleo.....20

3.2. Asfaltenos.....21

3.2.1. Classificação dos Asfaltenos.....23

3.2.2. Precipitação de Asfaltenos.....24

3.2.3. Degradação de Asfalteno por Pirólise.....28

3.3. Biodegradação.....29

3.3.1. Biodegradação de Saturados.....31

3.3.2. Biodegradação de Aromáticos.....31

3.3.3. Biodegradação de Asfaltenos.....32

3.4. Micro-organismos Degradadores de Hidrocarbonetos.....33

3.5. *Yarrowia lipolytica*.....34

3.5.1. Degradação de Substratos Hidrofóbicos.....35

3.5.2. Capacidade de Degradação do Petróleo.....38

**Capítulo 4 – Materiais e Métodos.....39**

4.1. Materiais.....39

4.1.1. Reagentes.....39

4.1.2. Equipamentos.....39

4.1.3. Petróleo.....40

4.1.4. Meios de Cultivo.....41

4.1.5. Micro-organismo.....41

4.2. Metodologias.....42

4.2.1. Esterilização.....42

4.2.2. Manutenção da Cultura.....42

4.2.3. Inóculo.....42

4.2.4. Extração dos Asfaltenos..... 42
4.2.5. Experimentos Preliminares..... 44
4.2.6. Experimentos Controle..... 45
4.2.7. Estudo da Influência de Solventes Orgânicos no Crescimento Celular da levedura *Yarrowia lipolytica*..... 45
4.2.8. Planejamento Experimental..... 46
4.2.9. Extração das Amostras após Biodegradação pela *Yarrowia lipolytica*.....48
4.2.10. Tratamento das Amostras Extraídas..... . 48
4.3. Métodos Analíticos.....49
4.3.1. Análise de Crescimento Celular de *Yarrowia lipolytica*..... 49
4.3.2. Análise de Biodegradação por GPC.....50
4.3.3 Análise de Biodegradação por GC-FID..... .....51

**Capítulo 5 – Resultados e Discussão..... 52**
5.1. Experimentos Preliminares.....52
5.2. Estudo da Influência de Solventes Orgânicos no Crescimento Celular da levedura *Yarrowia lipolytica*..... .....54
5.3. Planejamento Experimental.....58
5.4. Análise da Biodegradação por GPC..... 65
5.5. Análise da Biodegradação por GC-FID..... 67

**Capítulo 6 – Conclusões..... 72**

**Capítulo 7 – Sugestões.....74**

**Capítulo 8 – Referências Bibliográficas.....75**

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Modelo continental de uma estrutura molecular de asfalteno..... .....23
Figura 3.2: Modelo arquipélago de uma estrutura molecular de asfalteno..... .....24
Figura 3.3: Efeito da pressão na precipitação de asfaltenos..... .....25
Figura 3.4: Efeito da temperatura sobre a solubilidade de asfaltenos..... .....26
Figura 3.5: Efeito da temperatura sobre a pressão inicial da precipitação de asfaltenos em contato com propano..... .....26
Figura 3.6: Representação da formação de uma região instável durante a decomposição térmica do óleo bruto dos compostos de alto peso molecular... .....27
Figura 3.7: Esquema de principais parâmetros que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos no meio ambiente..... .....30
Figura 3.8: Principais vias metabólicas e compartimentos celulares envolvidos na degradação de substratos hidrofóbicos. ..... .....36
Figura 3.9: Etapas de oxidação primária de alcanos..... .....37
Figura 4.1: Observação microscópica da levedura *Yarrowia lipolytica* durante o crescimento em glicerol..... .....41
Figura 4.2: Método de extração e quantificação do teor de asfaltenos segundo ASTM 6560-00. ..... .....43
Figura 4.3: Asfalteno obtido após extração segundo ASTM 6560-00..... .... .....44
Figura 4.4: Coluna cromatográfica..... .....49
Figura 4.5: Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Y. lipolytica* através de medida de absorvância em espectrofotômetro BEL. ..... .50
Figura 4.6: Equipamento de Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama Perkin Elmer modelo *Clarus 400*..... .....51
Figura 5.1: Crescimento microbiano de *Y. lipolytica.* em meio de cultivo cotendo asfaltenos como fonte de carbono. O branco foi preparado tendo glicose 2% como fonte de carbono..... .....52
Figura 5.2: Influência da concentração de asfalteno no crescimento microbiano de *Y. lipolytica*..... .....53
Figura 5.3: Influência de solventes orgânicos no crescimento celular de *Y. lipolytica*, usando como fonte de carbono glicose 2%. O controle foi preparado na ausência de solventes..... .....54
Figura 5.4: Crescimento celular de *Y. lipolytica* na presença dos solventes

orgânicos, usando como fonte de carbono asfalteno A..... .....56
Figura 5.5: Crescimento celular de *Y. lipolytica* na presença dos solventes orgânicos, usando como fonte de carbono asfalteno B..... .....56
Figura 5.6: Asfalteno disperso no meio de cultivo aquoso durante os experimentos... ..58
Figura 5.7: Modelo Box-Cox (TPH totais saturados) pelo software *Design Expert*.. ... .62
Figura 5.8: Modelo Box-Cox raiz quadrada (TPH totais saturados) pelo software *Design Expert*..... .....62
Figura 5.9: Modelo raiz quadrada (TPH totais saturados) pelo software Design Expert.....63
Figura 5.10: Análise de influência das variáveis no modelo cúbico ..... .....64
Figura 5.11: Análise de interação entre as variáveis independentes (*software Design Expert*), A (asfalteno/agitação), B (inóculo/agitação) e C (inóculo/asfalteno).... .....65
Figura 5.12: Análise do asfalteno A por GPC para as amostras de asfalteno bruto e ensaio 05 ..... ..... .... 66
Figura 5.13: Análise do asfalteno B por GPC para os as amostras de asfalteno bruto, ensaios 05 e 17 ..... 67
Figura 5.14: Cromatograma da fração saturada do asfalteno A bruto (a) e fração saturada do asfalteno após processo de biodegradação por *Yarrowia lipolytica* (b) referente as condições do ensaio 5……. .....68
Figura 5.15: Cromatograma da fração aromática do asfalteno A bruto (a) e fração saturada do asfalteno após processo de biodegradação por *Yarrowia lipolytica* (b) referente as condições ao ensaio 01..... .....69
Figura 5.16: Cromatograma da fração aromática do asfalteno A (a) e da fração aromática do asfalteno B (b) após processo de biodegradação por *Yarrowia lipolytica*, referente as condições do ensaio 16.....70

# ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Frações típicas do petróleo..... .. .....19
Tabela 3.2: Análise elementar média do óleo cru..... .....19
Tabela 3.3: Classificação do petróleo de acordo com o Grau API.... .. .....20
Tabela 4.1: Composição química dos petróleos A e B..... .. .....40
Tabela 4.2: Viscosidade dos petróleos A e B em função da temperatura. ..... ....40
Tabela.4.3: Teor de água dos petróleos A e B determinado por Karl Fischer segundo ASTM D4377-00..... . .....40
Tabela 4.4: Experimento preliminar I..... . .....45
Tabela 4.5: Experimento preliminar II..... . .....45
Tabela 4.6: Variáveis e níveis analisados no planejamento experimental..... .....46
Tabela 4.7: Experimentos realizados segundo planejamento experimental..... ..... ..47
Tabela 5.1: Planejamento experimental associado aos resultados obtidos na análise em GC-FID para o asfalteno A..... ..59
Tabela 5.2: Resultados do asfalteno A bruto obtidos na análise em GC-FID..... ..... .60
Tabela 5.3: Modelos obtidos pelo software *Design Expert*® ..... .. .61

# 1. INTRODUÇÃO

O petróleo constitui uma das principais fontes de energia do planeta e para atender essa crescente demanda (PESARINI, 2008), os processos petroquímicos estão em constante desenvolvimento nos países produtores de petróleo. Estudos, técnicas e pesquisas estão cada vez mais direcionados para essa área promissora, visando aumentar a produção, otimizar o processo e minimizar os interferentes.

Um dos maiores problemas envolvidos no refino do petróleo é a precipitação de componentes pesados do óleo cru (TAVASSOLI *et al.*, 2011). As condições do reservatório e as propriedades dos fluidos, tais como pressão, temperatura, taxa de diluição e o peso molecular do fluido injetado podem levar a agregação e precipitação de partículas pesadas do petróleo (AMIN *et al.*, 2010). Algumas características do próprio óleo cru, como densidade e viscosidade, também podem influenciar negativamente a solubilização dessas impurezas (ABBASNEZHAD *et al.*, 2011). Um dos principais compostos responsáveis pela precipitação desses resíduos na produção de petróleo e de seus sub-produtos são os asfaltenos.

O asfalteno é uma fração pesada do petróleo formado predominantemente por anéis aromáticos policondensados com grupos de cadeias laterais hidrocarbônicas, contendo heteroátomos como oxigênio, enxofre e nitrogênio (PERAZA *et al.*, 2010). Para caracterizar tais estruturas complexas, vários modelos têm sido propostos, dentre os quais pode-se citar as configurações: continental, definida por asfaltenos com uma grande região aromática central; e arquipélago, definida por moléculas com grupos aromáticos menores ligados por ponte de alcanos (MERDRIGNAC *et al., 2006*).

Qualquer interação química ou física que provoque uma alteração no parâmetro de solubilidade dos componentes do petróleo em relação ao meio líquido fará com que haja uma incompatibilidade promovendo instabilidade no sistema com separação de fases, formação de sedimento ou formação de borras (SPEIGHT, 1998). Tavassoli *et al.* (2011) sustentaram que a precipitação desses compostos causa diferentes problemas, como o bloqueio de tubos de extração e de transporte de petróleo e poluição dos ecossistemas. Além disso, asfaltenos são conhecidos por serem precursores de coque em catálise ácida e inibidores de catalisador (MERDRIGNAC *et al., 2006*), nos processos térmicos das refinarias limitando a conversão de produtos (SPEIGHT, 1998).

No mundo de hoje, processos que envolvam a conversão de resíduos em produtos mais nobres estão se tornando cada vez mais importantes, devido a uma série de fatores econômicos e de mercado. Com o alto consumo de produtos de petróleo e derivados, um dos desafios a enfrentar é tratar adequadamente os resíduos de óleo cru pesado, que contém uma elevada concentração de asfaltenos (GAUTHIER *et al*., 2008). Esses compostos podem ser reaproveitados através de tratamentos específicos. (DANIAL-FORTAIN *et al*., 2010). Um dos processos que podem ser empregados com o intuito de reaproveitamento dessas impurezas nas refinarias é a biodegradação.

A degração biológica de hidrocarbonetos apresenta potencial e a escolha do micro-organismo deve direcionar ao biocatalisador que proporcionará uma melhor interação e homogeneidade do meio aquoso com o meio hidrofóbico. Para estas condições, a levedura *Yarrowia lipolytica* é considerada uma das mais bem relatadas (AMARAL *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2010). *Y. lipolytica* é uma levedura única, estritamente aeróbia, com a capacidade de utilizar hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono e energia, degradando substratos hidrofóbicos como n-alcanos, ácidos graxos, gorduras e óleos para o qual tem vias metabólicas específicas. Além disso, essa propriedade é muitas vezes acompanhada pela capacidade de produção de biossurfactante. Sua afinidade por compostos hidrofóbicos ocorre devido a produção de compostos ativos de superfície e sua parede celular diferenciada (AMARAL *et al.*, 2009). Portanto, *Y. lipolytica* está emergindo como um agente promissor na degradação do óleo cru (FERREIRA, 2009).

Esse estudo teve como objetivo degradar de forma parcial asfaltenos obtidos a partir de um resíduo de petróleo visando sua conversão em uma fração oleosa de maior valor agregado, como por exemplo as resinas. Considerando que este derivado apresenta estrutura de alto peso molecular e se encontra disperso na forma coloidal no petróleo, sendo precursor de coque e inibidor de catalisador, a transformação estrutural possibilitaria a produção de compostos economicamente viáveis a partir de um resíduo de processo.

Alguns estudos de análise de asfalteno foram realizados na tentativa de caracterizar a estrutura obtida após o processo de degradação por *Yarrowia lipolytica* por cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas e cromatografia de permeação em gel.

# 2. OBJETIVOS

O principal objetivo que norteou esta dissertação foi viabilizar tecnicamente a degradação parcial de asfalteno de dois modelos diferentes, arquipélago e continental, por ação da levedura *Yarrowia lipolytica*, com o intuito de gerar através de um resíduo de processo de refino um produto de maior valor agregado tal como as resinas.

Para alcançar este objetivo foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Extrair asfaltenos com características estruturais diferentes, sendo um modelo predominantemente arquipélago e outro continental, a partir de dois petróleos brasileiros.
- Realizar estudos preliminares do crescimento celular de *Y. lipolytica* em meio de cultura contendo asfalteno como única fonte de carbono.
- Estudar previamente a influência dos solventes orgânicos acetofenona, tetrahidrofurano e tolueno no processo catalisado por *Y. lipolytica*, na tentativa de obter uma melhor homogeneização do asfalteno em meio aquoso.
- Empregar o planejamento experimental para determinação da influência das variáveis estudadas (agitação, concentração inicial de inóculo e concentração de asfalteno) durante o crescimento microbiano e seus níveis.
- Avaliar o potencial de biodegradação de asfalteno por cromatografia de permeação em gel e cromatografia gasosa por detecção de ionização de chamas.

# 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 3.1. Petróleo

Existem diversas teorias para explicar a origem do petróleo. A mais aceita atualmente é a de origem orgânica, ou seja, tanto o petróleo como o gás natural são combustíveis fósseis. Essa teoria considera que o petróleo tem origem a partir da matéria orgânica basicamente oriunda de micro-organismos e algas, depositadas juntamente com sedimentos marinhos. À medida que foram se acumulando, formavam camadas que iam progressivamente afundando e sendo recobertas por outros tipos de sedimentos. Assim, impedidos do contato com o ar, ficaram protegidas contra o processo de oxidação (TEIXEIRA *et al.*, 2003). A necessidade de condições não-oxidantes, pressupõe um ambiente de deposição, composto de sedimentos de baixa permeabilidade, e inibidor da ação da água circulante em seu interior. A interação dos fatores – matéria orgânica, sedimento e condições termoquímicas apropriadas – é fundamental para o início da cadeia de processos que leva à formação do petróleo (THOMAS, 2001).

O petróleo pode ser definido quanto à sua composição química como uma mistura complexa de ocorrência natural, consistindo predominantemente de hidrocarbonetos (podendo chegar a mais de 90% de sua composição) e não-hidrocarbonetos compostos por derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organometálicos. Em geral, o petróleo é inflamável à temperatura ambiente, e suas propriedades físicas apresentam grandes variações (SPEIGHT, 2001).

O petróleo não é uma substância uniforme e suas características variam de acordo com o campo produtor e até dentro de um mesmo campo, podendo estar dissolvidos em sua massa líquida gases, sólidos e suspensões coloidais (VALLE, 2007). Portanto, podem existir petróleos muito fluidos e claros, com grandes quantidades de destilados leves, até petróleos muito viscosos e escuros com grandes quantidades de espécies pesadas. Normalmente, o petróleo apresenta-se como um líquido escuro, oleoso, onde agregados moleculares de diferentes tamanhos e composições são encontrados (MURGICH *et al.*, 1996; BARKER, 1985).

### 3.1.1. Constituintes do Petróleo

O petróleo contém centenas de compostos químicos e, separá-los em componentes puros, é praticamente impossível. O petróleo é normalmente separado em frações típicas, de acordo com a faixa de ebulição dos compostos, como as apresentadas na Tabela 3.1 (THOMAS, 2001).

Tabela 3.1: Frações típicas do petróleo

| Fração | Composição aproximada | Usos |
|---|---|---|
| Gás residual | $C_1$ - $C_2$ | gás combustível. |
| Gás liquefeito de petróleo - GLP | $C_3$ - $C_4$ | gás combustível engarrafado, uso doméstico e industrial |
| Gasolina | $C_5$ - $C_{10}$ | combustível de automóveis, solvente. |
| Querosene | $C_{11}$ - $C_{12}$ | iluminação, combustível de aviões a jato. |
| Gasóleo leve | $C_{13}$ - $C_{17}$ | diesel, fornos. |
| Gasóleo pesado | $C_{18}$ - $C_{25}$ | combustível, matéria-prima para lubrificantes. |
| Lubrificantes | $C_{26}$ - $C_{38}$ | óleos lubrificantes, |
| Resíduo | $C_{38+}$ | asfalto, piche, impermeabilizantes. |

Fonte: THOMAS, 2001

Apesar destas diferenças em suas características físicas, sua composição elementar varia muito pouco, porque o óleo cru é composto por séries homólogas de hidrocarbonetos. As diferenças físicas são decorrentes da quantidade relativa de cada série homóloga e dos componentes individuais. A faixa de variação da composição elementar do óleo bruto é bem estreita, como mostrado na Tabela 3.2 (VALLE, 2007).

Tabela 3.2: Análise elementar média do óleo cru

| | |
|---|---|
| Hidrogênio | 11 - 14% |
| Carbono | 83 - 87% |
| Enxofre | 0,06 - 8% |
| Nitrogênio | 0,11 - 1,7% |
| Oxigênio | 0,1 - 2% |
| Metais | até 0,3% |

Fonte: VALLE, 2007

Os diferentes tipos de petróleo são classificados segundo uma gradação que vai de leves (menos densos) a pesados (mais densos). De acordo com as normas do Instituto Americano do Petróleo (*American Petroleum Institute*), essa classificação é conhecida como "grau API". Segundo essa classificação, quanto menor a densidade do petróleo, maior o grau API e maior o valor comercial do petróleo. A partir disso, é possível produzir uma parcela maior de derivados nobres, de valor comercial mais alto (SPEIGHT, 2006). A relação da classificação do petróleo em função do grau API é mostrada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Classificação do petróleo de acordo com o Grau API

| DENSIDADE °API | CLASSIFICAÇÃO |
|---|---|
| ºAPI > 40 | Extraleve |
| 40 > ºAPI > 33 | Leve |
| 33 > ºAPI > 27 | Médio |
| 27 > ºAPI > 19 | Pesado |
| 19 > ºAPI > 15 | Extrapesado |
| ºAPI < 15 | Asfáltico |

Fonte: VALLE, 2007

Os hidrocarbonetos presentes no petróleo podem ser classificados em quatro classes principais: saturados (alcanos e cicloparafinas), aromáticos (hidrocarbonetos mono, di e poliaromáticos), resinas (frações constituídas de moléculas polares contendo heteroátomos como N, O ou S) e asfaltenos (são moléculas similares às resinas, porém possuindo maior massa molecular e núcleo poliaromático). Essa classificação é conhecida por SARA (TISSOT e WELT, 1984; SPEIGHT, 2001).

### 3.1.2. Refino do Petróleo

O refino do petróleo consiste em uma série de beneficiamentos pelos quais passa o mineral bruto para obtenção de derivados de interesse comercial. Refinar petróleo, é portanto, separar as frações desejadas, processá-las e dar-lhes acabamento, de modo a obter-se produtos vendáveis (LIMA, 2008).

Os fenômenos de instabilidade causam dificuldades tais como a formação de sedimentos em transporte e em tanques de armazenamento e trocadores de calor e está relacionado com problemas de combustão.

Atualmente, um dos grandes problemas enfrentados na produção e no refino do petróleo é a precipitação de componentes pesados. O depósito destes compostos causa diversos problemas, como o bloqueio da extração de óleo bruto e de tubos de transporte, contaminação de catalisadores e poluição dos ecossistemas (WU e PRAUSNITZ, 2000; HONG E, 2004; TAVASSOLI *et al.*, 2011). Em particular, os óleos crus ricos em frações pesadas constituem um problema sério, pois qualquer alteração nas condições de equilíbrio entre as fases (LIMA, 2008) e suas baixas propriedades de fluxo propiciam o surgimento desses resíduos indesejáveis (REYNOLDS e BIGGS, 1988). Um dos principais compostos responsáveis pela precipitação de óleos crus pesados é o asfalteno. Sua complexa estrutura molecular não permite uma degradação fácil às populações de micro-organismos do ecossistema local, o que tende a produzir um acúmulo de impurezas em lugares onde o petróleo entra em contato (TAVASSOLI *et al.*, 2011).

Nos processos de refino, os asfaltenos são resíduos do processo e podem gerar problemas de precipitação e envenenamento de catalisadores (FERREIRA, 2009). Esse resíduo é gerado quando o poder de solubilização de um petróleo, ou uma mistura, é incapaz de manter os asfaltenos em solução. A tendência à precipitação é geralmente mais marcada pelos resíduos provenientes de processo catalítico severo e craqueamento térmico. Os asfaltenos são compostos que estão diretamente ligados ao fenômeno de precipitação orgânica. Um óleo cru que apresenta uma elevada concentração de asfaltenos afeta o processo de combustão produzindo corrosão e uma elevada contaminação ambiental por emissão de partículas.

## 3.2. Asfaltenos

O primeiro trabalho sobre asfaltenos foi publicado em 1837 pelo químico francês J. B. Boussingault (Boussingault *apud* STRAUSZ *et al.* 2006), que nomeou os frágeis e brilhantes resíduos da destilação atmosférica obtidos a partir de um betume e de uma amostra de asfalto estudada como "asfalteno". Muito mais tarde, na primeira parte do século 20, o método de precipitação com solvente foi introduzido para o isolamento de asfalteno a partir de produtos petrolíferos usando nafta de petróleo como

um precipitante, pelo químico alemão Marcusson, embora por cerca de uma década, resíduos inteiros da destilação eram esporadicamente referidos como asfalteno. A qualidade da nafta de petróleo foi especificada (ASTM Teste D 91-35) e a relação nafta/óleo (v/v) passou a ser indicada como 10:1 nesse processo. Na Segunda Guerra Mundial, concluiu-se que, para mais completa precipitação dos asfaltenos era necessário aumentar o volume da relação precipitante/óleo (30-40/1) e empregar um precipitante mais eficiente do que a nafta de petróleo que era aproximadamente tão eficaz quanto um precipitante como n-heptano ou n-hexano. n-pentano e isopentano, sendo usados para se obter 10-50% a mais de precipitado. Em 1941, Streiter introduziu n-pentano e este se tornou o padrão como precipitante de asfaltenos de petróleo até 1980, quando o n-heptano assumiu esse papel. Esta leitura breve da evolução histórica de métodos para o isolamento de asfaltenos é para salientar que não é possível dar uma definição rígida de asfalteno que é definido segundo uma classe de solubilidade. Esta dificuldade é uma das consequências dos efeitos combinados de seus constituintes químicos, variação na distribuição de tamanho molecular e capacidade de agregação (STRAUSZ *et al.*, 2006).

Os asfaltenos são a fração do petróleo de mais alto ponto de ebulição. Consistem em uma mistura heterogênea complexa de moléculas altamente polidispersas em termos de tamanho e composição química, compostas por anéis poliaromáticos condensados, cadeias alifáticas, anéis naftênicos, e que contêm heteroátomos como nitrogênio, oxigênio e enxofre, apresentando-se na forma de ácidos carboxílicos, amidas, aminas e alcoóis, e metais como ferro, níquel e vanádio. São considerados a fração do petróleo que apresenta maior número de núcleos aromáticos e a maior massa molecular. A definição mais aceita para os asfaltenos está relacionada com a sua solubilidade e diz que os asfaltenos são insolúveis em hidrocarbonetos alifáticos, tais como n-heptano ou n-pentano e solúveis em hidrocarbonetos aromáticos como o tolueno (MOSCHOPEDIS *et al.*, 1976 MURGICH *et al*, 1996; SPEIGHT, 1998; ANDERSEN e SPEIGHT, 1999; LEÓN *et al.*, 2001; MURGICH, 2002; MULLINS *et al.*, 2003; GAUTHIER *et al.*, 2008).

Os asfaltenos são uma fração extremamente complexa, difícil de caracterizar, sendo os maiores problemas relacionados ao verdadeiro peso molecular e à presença de vários tamanhos de grupos aromáticos e pontes de ligação (GRAY, 2003). Eles são responsáveis pela formação de sedimentos durante as operações de recuperação de petróleo, coque de produção em processos térmicos, e formação de borras durante o armazenamento de petróleo. No entanto, ao longo das últimas décadas, grandes avanços

têm sido feitos para entender a natureza dos asfaltenos e para resolver os problemas que surgem quando estes estão presentes em matérias-primas (SHEU e MULLINS, 1995; SPEIGHT, 1998).

### 3.2.1. Classificação dos Asfaltenos

Para a caracterização desta mistura complexa são encontrados atualmente dois modelos, classificados como continental e arquipélago. Modelos continentais (Figura 3.1) são baseados em um núcleo aromático contendo um grande número de anéis fundidos com ramificações de grupos alifáticos e pontes de enxofre (SHEREMATA *et al.*, 2004). Esse modelo determina que a atração entre as moléculas de asfalteno é conduzida pela interação entre as cadeias poliaromáticas e é limitada pelo impedimento estérico entre as cadeias alifáticas que cercam o núcleo aromático (DURAND *et al.*, 2010). Os modelos arquipélagos (Figura 3.2) são caracterizados por apresentarem pequenos grupos aromáticos ligados entre si por pontes alifáticas (SHEREMATA *et al.*, 2004). Mesmo que as interações anel-anel não sejam favorecidas devido a considerações estéreas, a agregação de asfaltenos neste modelo ocorre por ligações de pontes de hidrogênio (DURAND *et al.*, 2010). Segundo Acevedo *et al.* (2010), moléculas tipo arquipélago, dada a sua estrutura tridimensional, teriam rotação interna devido a graus de liberdade superiores ao tipo continental. Paralelamente, estudos de modelagem molecular comprovaram que o asfalteno continental apresenta maior tendência à associação do que estruturas com modelos arquipélagos (CARAUTA *et al.*, 2005).

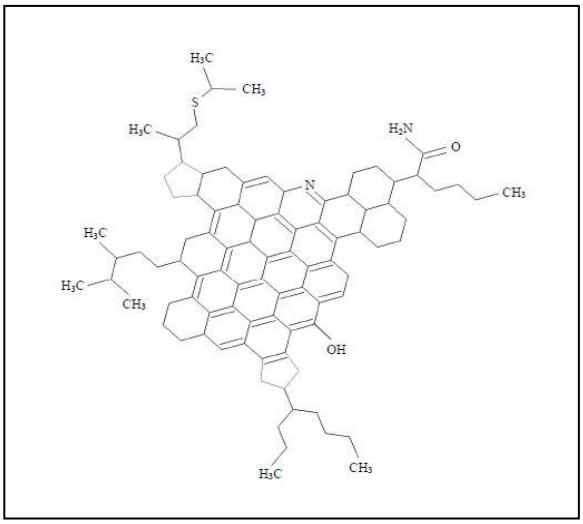



Figura 3.1: Modelo continental de uma estrutura molecular de asfalteno (http://ticsperu.wikispaces.com/)

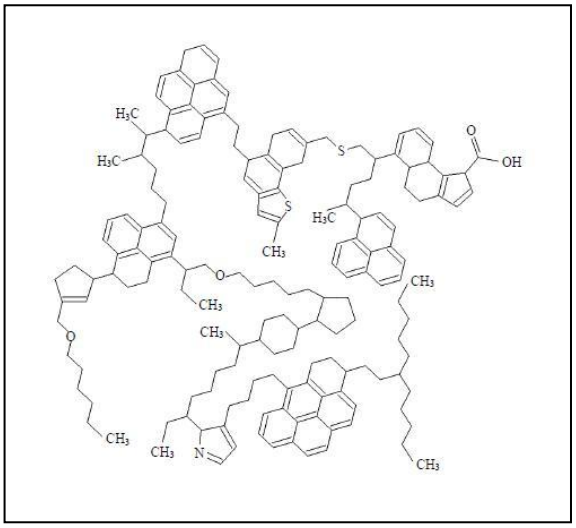



Figura 3.2: Modelo arquipélago de uma estrutura molecular de asfalteno (http://ticsperu.wikispaces.com/)

### 3.2.2. Precipitação de Asfaltenos

A precipitação de asfaltenos pode ser um interferente sério durante a produção e o processamento de óleo cru. Um considerável número de pesquisas tem sido direcionado para o problema da solubilidade dos asfaltenos em petróleos, a fim de evitar as condições para a precipitação (HONG, 2004). Esta deposição dependerá da composição do petróleo bruto, do agente precipitante, da pressão e temperatura do reservatório. A precipitação do asfalteno pode alterar a molhabilidade da formação e, assim, reduzir a eficiência de varredura do reservatório. Portanto, a previsão de precipitação de asfaltenos é um procedimento utilizado para injeção de solventes no reservatório de óleo como um meio para evitar entupimentos (AMIN *et al.*, 2010).

Os asfaltenos são mutuamente solúveis em petróleo, enquanto certas proporções são mantidas na mistura (HONG E, 2004). Quando separados do óleo cru de origem, não permanecem em equilíbrio físico, o que resulta em soluções com propriedades mal definidas (BEHAR e PELET, 1984). Alteração em algumas condições como pressão, temperatura ou composição do óleo, podem alterar este equilíbrio. Consequentemente, as moléculas pesadas e polares, podem separar-se da mistura levando a problemas de agregação e deposição de partículas (HONG E, 2004; MOHAMMADI *et al.*, 2011).

Na produção de petróleo, os asfaltenos podem aumentar a densidade e a viscosidade dos óleos a ponto da produção comercial tornar-se muito difícil, se não impossível, por meios convencionais (BEHAR e PELET, 1984). Algumas pesquisas

(HIRSCHBERG *et al.*, 1984; WU e PRAUSNITZ, 2000) descreveram a termodinâmica molecular de precipitação de asfaltenos em fluidos de reservatório e confirmaram a influência de parâmetros como mudança de temperatura, pressão ou composição. A Figura 3.3 mostra o efeito da pressão sobre a precipitação do asfalteno no óleo bruto. O decréscimo de pressão acima do ponto de ebulição irá reduzir a solubilidade do asfalteno (HIRSCHBERG *et al.*, 1984).

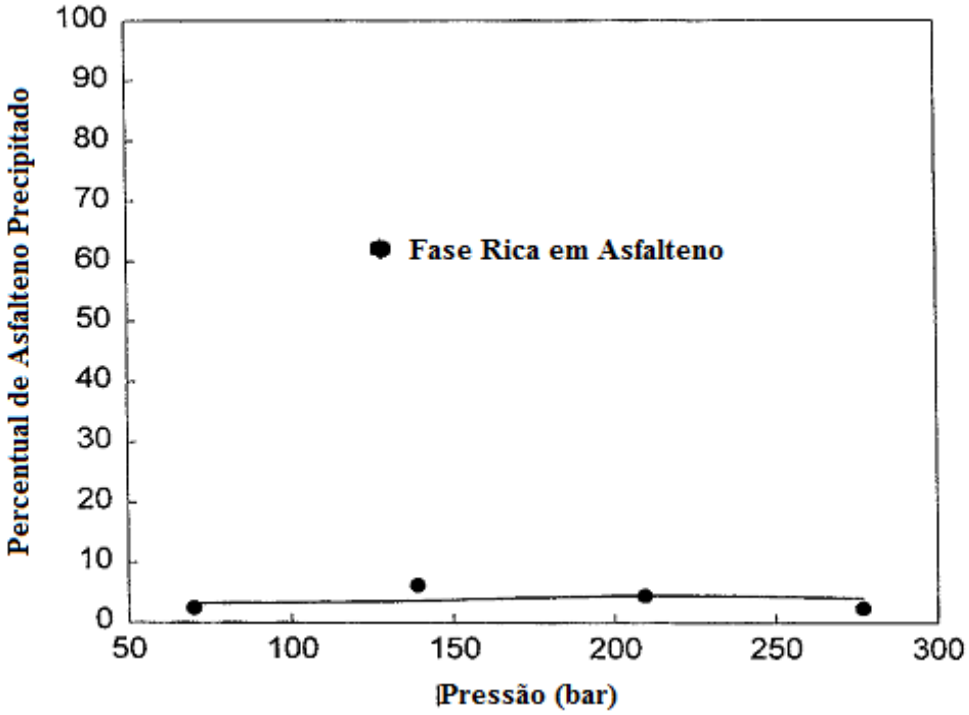



Figura 3.3: Efeito da pressão na precipitação de asfaltenos (WU e PRAUSNITZ, 2000).

O efeito da temperatura na solubilidade dos asfaltenos (Figura 3.4) é relatado por vários autores. Apesar de ser pouco sustentada a partir da literatura, há indícios que a concentração de asfaltenos solúveis em misturas aumenta com a variação de temperatura (HIRSCHBERG *et al.*, 1984; HONG E, 2004). Os asfaltenos diminuem o poder calorífico das partículas em queima, e por isso, tendem a formar lodos voláteis, sendo mais propensos ao surgimento de coque nas zonas de baixa temperatura. Uma porção importante da parte sólida dos combustíveis é constituída pelos asfaltenos que são indicados como a causa da formação de tamanho de chamas maiores, o qual se associa com a freqüência de carbonização dos geradores de vapor, que por sua vez, provocam alta velocidade de corrosão em tubos de aquecedores e re-aquecedores.

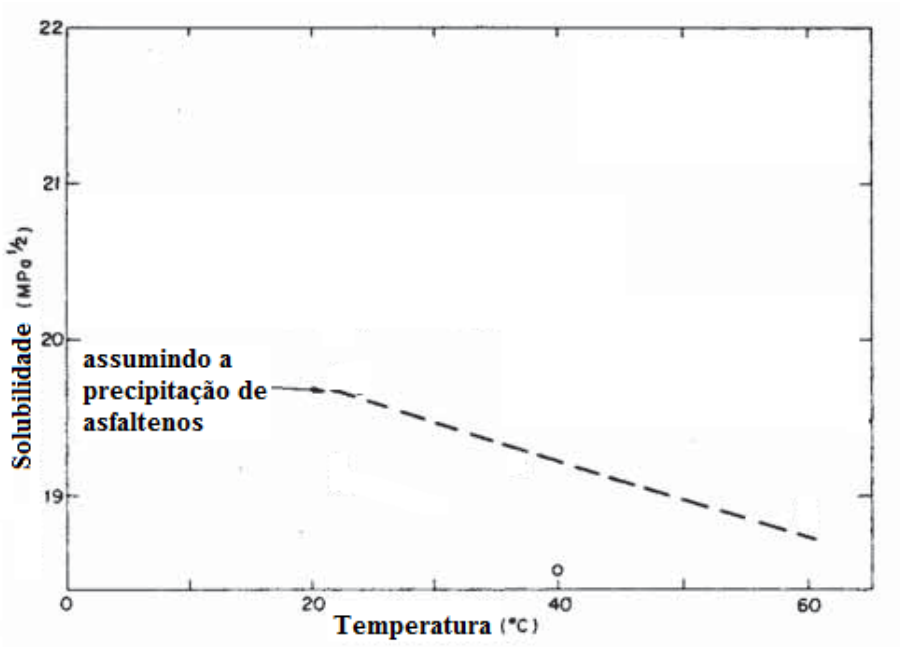



Figura 3.4: Efeito da temperatura sobre a solubilidade de asfaltenos (HIRSCHBERG *et al.*, 1984).

O modelo descrito por Wu e Prausnitz (2000) que mostra a relação entre o efeito da temperatura sobre a pressão na precipitação do asfalteno é apresentado na Figura 3.5. Este modelo prevê que a pressão é sensível às mudanças de temperatura porque a alteração na temperatura não só afeta as interações entre asfaltenos e resinas, mas também altera a composição de equilíbrio do asfalteno contido na fase líquida.

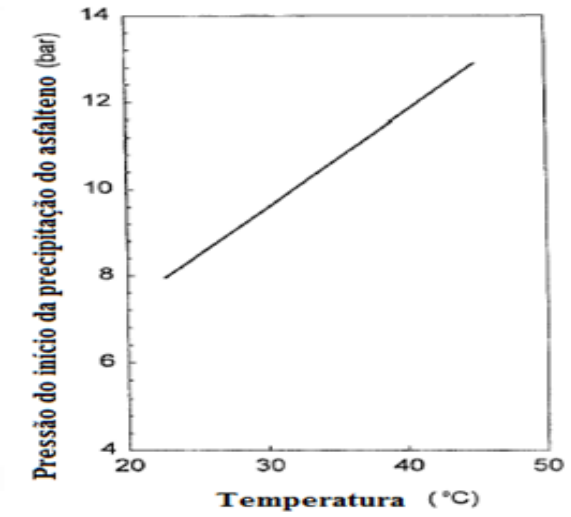



Figura 3.5: Efeito da temperatura sobre a pressão no início da precipitação de asfaltenos em contato com propano (WU e PRAUSNITZ, 2000).

Nesses processos, o produto mais prejudicial é o que permanece na superfície do catalisador e não pode ser adsorvido, resultando na formação de coque ou permanecendo de forma que bloqueie eficazmente a ação do catalisador. A causa de formação deste sedimento ou coque está intimamente relacionada com mecanismos de decomposição térmica dos componentes do petróleo e a alteração de caráter do meio líquido. A formação de produtos de hidrocarbonetos líquidos cria uma região de instabilidade, fazendo com que moléculas altamente aromáticas e altamente polares se separem a partir do óleo cru, como um fase insolúvel, gerando o coque conforme observado na Figura 3.6. Espécies aromáticas voláteis são eliminadas durante a decomposição térmica, e deve considerar-se que inicialmente algum carbono alifático desempenha um papel importante na formação de coque.

A instabilidade pode ocorrer durante uma série de processos térmicos, sendo por intenção ou inadvertidamente quando a separação é prejudicial. Assim, a separação desses sólidos ocorre sempre que as características de solvência da fase líquida não são mais adequadas para manter os componentes de elevado peso molecular em solução (SPEIGHT, 1998).

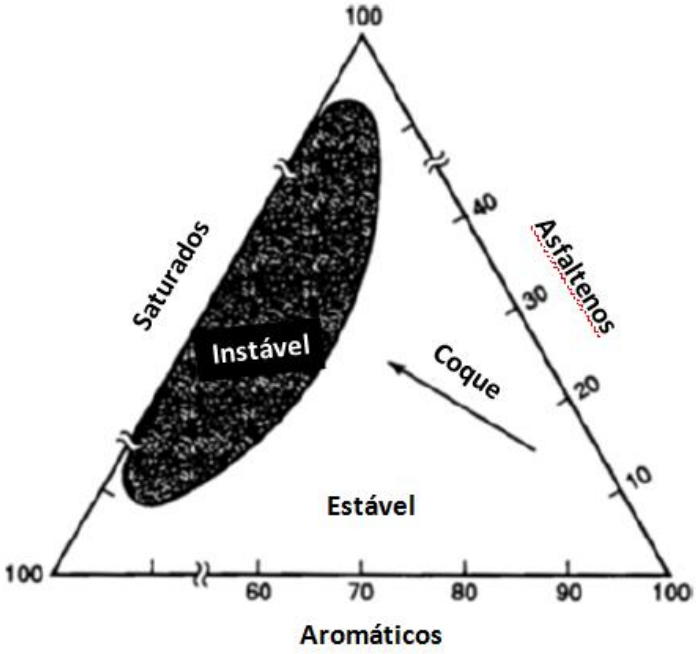



Figura 3.6: Representação da formação de uma região instável durante a decomposição térmica do óleo bruto dos compostos de alto peso molecular (adaptado de SPEIGHT, 1998).

Todas estas propriedades não são compartilhadas com mesmo grau por todos os asfaltenos, então há uma necessidade de procedimentos adequados de caracterização (BEHAR e PELET, 1984). Diferentes estratégias estão disponíveis para assegurar a melhoria das matérias-primas de resíduos pesados que contêm asfaltenos que possam ser removidos do resíduo ou convertidos. Remoção de asfaltenos é industrialmente viável através extração líquido-líquido, produzindo de um lado asfaltos e, no outro lado, óleo desasfaltado. Ou através de um processo de craqueamento térmico onde as moléculas de asfalteno são convertidas em coque. No entanto, é também possível considerar a conversão de asfaltenos em hidrocarbonetos valiosos (MERDRIGNAC *et al., 2006*).

A química do processo de refino está preocupada principalmente com a produção, não só de melhores produtos, mas também de materiais vendáveis (SPEIGHT, 1998). Para resolver estes problemas métodos químicos, mecânicos, térmicos e eletromagnéticos ou combinações dos mesmos têm sido aplicados. Os métodos atuais para a remoção ou prevenção de precipitados pesados são caros e problemáticos. Por um lado, o aumento da restrição ambiental, os altos custos e perigos causados por métodos químicos convencionais, e por outro lado, os processos biológicos que possuem custo mais reduzido e procedimentos menos agressivos têm levado ao aumento no número de pesquisadores e companhias de petróleo interessados nestas metodologias (TAVASSOLI *et al.*, 2011).

### 3.2.3. Degradação de Asfaltenos por Pirólise

A pirólise dos asfaltenos, em condições cuidadosamente controladas, imitam o processo de geração de petróleo a partir do querogênio que ocorreu em tempos geológicos e, por isso, regeneram hidrocarbonetos saturados similares aos do óleo cru original. Essa técnica geoquímica em asfaltenos pode ser usada no acompanhamento do processo de evolução secundária dos reservatórios de petróleo (OUDOT e CHAILLAN, 2010).

Pirólise rápida liberta porções, as quais representam compostos constituintes de asfaltenos, de um tamanho adequado para análise em cromatografia gasosa e com pouca possibilidade de recombinação após a sua libertação (BEHAR e PELLET, 1984). Foi aplicada com sucesso para o monitoramento a longo prazo do derramamento de óleo.

Este método permite a reconstituição da fração saturada do óleo original a partir da fração asfaltênica severamente degradada do resíduos de petróleo (OUDOT e CHAILLAN, 2010).

Behar e Pellet (1984) utilizaram em suas pesquisas condições de pirólise entre 450 e 550°C durante 30 segundos em gás hélio, com aquecimento preliminar a 300ºC durante 2 minutos com intuito de eliminar por vaporização qualquer material não asfaltênico.

Rubinstein *et al.* (1979) utilizaram pirólise para degradação de asfalteno em frascos à vácuo sob condições de 300ºC em 72 horas e após foram arrefecidos a -6ºC. Os resultados envolvendo gravimetria e análise elementar, antes e depois da degradação foram sobreponíveis, concluindo que pirólise não obteve nenhum efeito sobre os asfaltenos. Stojanovic *et al*. (2009) também empregaram a mesma técnica a 400ºC durante 4 horas em autoclave sob uma atmosfera de nitrogênio.

Apesar de alguns estudos (RUBINSTEIN *et al.*, 1979; BEHAR e PELLET, 1984; STOJANOVIC *et al*., 2009) terem tido êxito na utilização de degradação por pirólise, esta técnica não foi empregada no nosso trabalho, devido as altas condições de temperatura. Considerando que o aumento da temperatura acarreta em um aumento na solubilidade dos asfaltenos em óleos crus, e se o que deseja neste estudo é uma degradação parcial ao invés de completa solubilização do asfalteno, preferiu-se empregar a degradação através de micro-organismos, método com condições mais brandas comparadas à pirólise.

## 3.3. Biodegradação

Processos de conversão de resíduos estão se tornando cada vez mais importantes no mundo de hoje, por causa do mercado e vários fatores econômicos (MERDRIGNAC *et al.*, 2006). A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo é o resultado da oxidação de certos componentes do óleo derramado, por micro-organismos como bactérias, fungos, algas unicelulares e protozoários. É um mecanismo natural de descontaminação e remoção do óleo que possui eficiência variável, de acordo com as características físicas do próprio óleo, e também do ambiente, como temperatura, nutrientes e oxigênio presentes no local. Este procedimento é normalmente priorizado em muitos casos uma

vez que não causa danos adicionais ao ecossistema. No entanto, normalmente, conjuga-se a este procedimento outros métodos de descontaminação (FERREIRA, 2009).

Assim, os parâmetros que impactam o sucesso de biodegradação podem ser classificados em três categorias interrelacionadas (Figura 3.7):

a) propriedades do micro-organismo ou comunidade microbiana,

b) condições ambientais para auxiliar o crescimento de micro-organismos, e

c) propriedades do substrato (i.e., hidrocarbonetos). Um dos fatores importantes na remoção biológica de hidrocarbonetos a partir de um ambiente contaminado é a sua biodisponibilidade para uma população microbiana ativa (ABBASNEZHAD *et al.*, 2011).

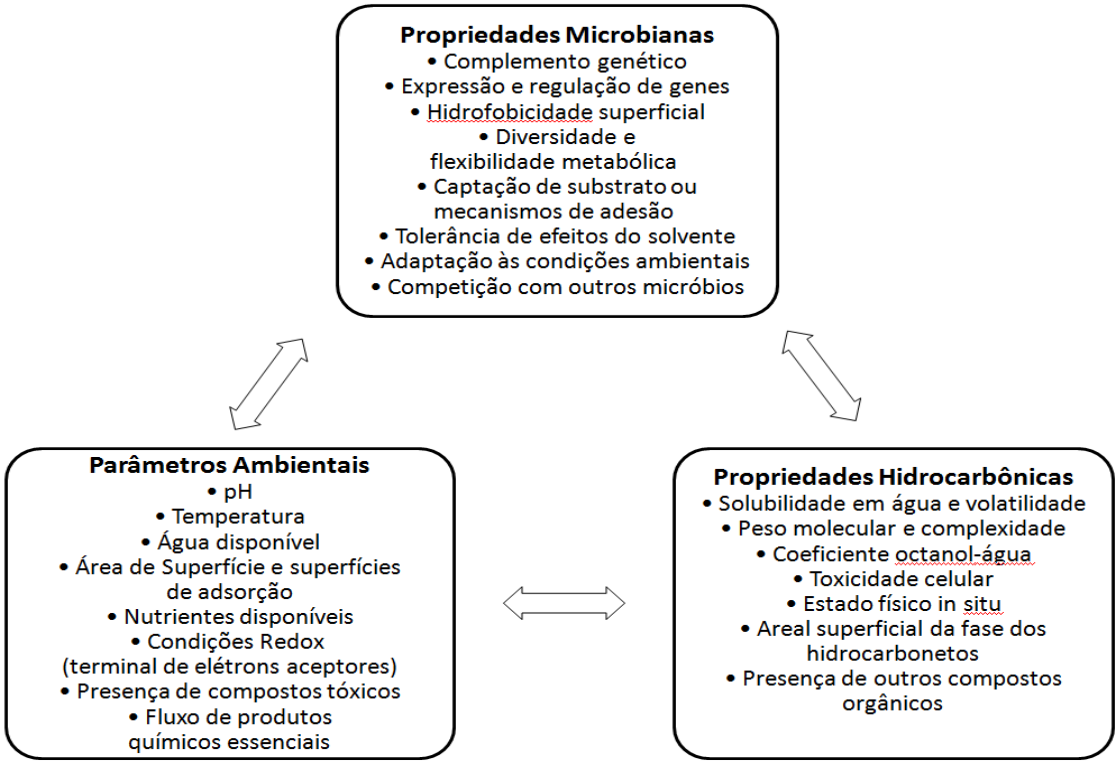



Figura 3.7: Esquema de principais parâmetros que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos no meio ambiente (adaptado de ABBASNEZHAD *et al.*, 2011).

A biodegradação microbiana de hidrocarbonetos é conhecida por ser um processo eficiente e de escolha como tratamento primário para a descontaminação de ambientes poluídos por petróleo. Entre os fatores que afetam a biodegradabilidade do petróleo, a composição química inicial é um parâmetro importante. Qualquer produto de petróleo é composto por uma mistura de componentes individuais, alguns dos quais são

completamente biodegradáveis, e outros, intrinsecamente resistentes ou refratários ao metabolismo microbiano tais como resinas, asfaltenos, hidrocarbonetos policíclicos saturados e aromáticos. Então, a importância relativa dos diferentes tipos de estruturas moleculares determina a biodegradabilidade máxima do produto (OUDOT, 2000).

### 3.3.1. Biodegradação de Saturados

Geralmente, os n-alcanos saturados são os componentes mais facilmente degradáveis em uma mistura de petróleo. Biodegradação de n-alcanos com pesos moleculares até $C_{44}$ foi demonstrada (VENOSA e ZHU, 2003). Alcanos na gama $C_{10}$ a $C_{26}$ são considerados os hidrocarbonetos mais frequentemente utilizados. O mecanismo predominante de degradação de n-alcano envolve a oxidação terminal para o correspondente álcool, aldeído, ou ácido graxo. Alcanos ramificados são menos facilmente degradados em comparação com n-alcanos. Ramificação metil aumenta a resistência ao ataque microbiano porque poucos degradadores de alcanos podem superar o bloqueio da beta-oxidação (NAS, 1985). Alcanos isoprenóides altamente ramificados, tais como pristano e fitano, os quais foram anteriormente pensados como sendo resistentes à degradação, também têm mostrado serem facilmente biodegradáveis. No entanto, cicloalcanos são particularmente resistentes à degradação. Alicíclicos complexos, tais como hopanos e esteranos estão entre os compostos mais persistentes de derramamentos de petróleo no meio ambiente (VENOSA e ZHU, 2003).

Quando os alcanos são facilmente degradáveis e o estoque se exaure, a comunidade microbiana passa a consumir outros compostos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (TAHHAN *et al.*, 2011).

### 3.3.2. Biodegradação de Aromáticos

Embora os compostos aromáticos sejam geralmente mais resistentes à biodegradação, alguns aromáticos de baixo peso molecular, tais como naftaleno, podem realmente ser oxidados antes de muitos componentes saturados. Hidrocarbonetos monoaromáticos são tóxicos para alguns micro-organismos, devido à sua ação solvente sobre as membranas celulares, mas em concentrações baixas, eles são facilmente biodegradáveis em condições aeróbias. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com 2-

4 anéis são menos tóxicos e biodegradáveis em taxas que diminuem com o aumento do nível de complexidade da molécula. Já com cinco ou mais anéis só podem ser degradados através de cometabolismo (VENOSA e ZHU, 2003), que implica na oxidação concomitante de um substrato não utilizado durante o crescimento de um micro-organismo em uma fonte de carbono utilizável (HORVATH, 1972). Aromáticos com grupos mais alquilados são degradados menos rapidamente do que os menos alquilados (VENOSA e ZHU, 2003).

As vias metabólicas para a biodegradação de compostos aromáticos tem sido objeto de estudos específicos (ATLAS, 1981; PRINCE, 1993). A degradação bacteriana de aromáticos normalmente envolve a formação de um diol, seguido por clivagem do anel e formação de um ácido di-carboxílico, reações mediadas por dioxigenases. Os fungos e outros eucariotos normalmente oxidam compostos aromáticos usando mono-oxigenases, formando em um trans-diol (VENOSA e ZHU, 2003). Os compostos aromáticos de baixo peso molecular, como o naftaleno, são facilmente degradados pelos micro-organismos marinhos. Moléculas com estruturas mais complexas, contendo ramificações de quatro ou mais anéis aromáticos, como o benzopireno, são degradados por um número menor de micro-organismos e com uma taxa de degradação inferior, se comparado à moléculas de estruturas mais simples (ATLAS, 1981).

### 3.3.3 Biodegradação de Asfaltenos

Comparando aos hidrocarbonetos saturados e aromáticos, muito pouco se sabe sobre a biodegradação de asfaltenos, isto devido à sua estrutura complexa, que é de difícil análise. Resinas e asfaltenos foram previamente considerados refratários à degradação. No entanto, há evidências recentes da degradação de asfaltenos através de co-metabolismo (VENOSA e ZHU, 2003).

Rontani *et al.* (1985) observaram que a biodegradação da estrutura asfaltênica ocorre por uma diminuição das cadeias laterais, em conjunto com uma diminuição da proporção de átomos de carbono aromático, que pode ser explicada pela quebra das estruturas policondensadas (parcialmente oxidado) contendo uma proporção importante de carbonos aromáticos.

## 3.4. Micro-organismos degradadores de Hidrocarbonetos

Diversos tipos de micro-organismos vêm sendo descritos como degradadores de compostos de petróleo, como fungos e leveduras (*Trichoderma* spp., *Mortierella* spp, *Aspergillus* spp., *Penicilium* spp., *Candida* spp., *Rhodotorula* spp. e S*porobolomyces* spp.) (LEAHY e COLWELL, 1990), alguns produtores de biossurfactantes e emulsificantes (AMARAL, 2007), microalgas e principalmente as bactérias. A capacidade de um micro-organismo biodegradar hidrocarbonetos depende seu complemento genético e da expressão da informação genética, bem como as propriedades do hidrocarboneto em si (ABBASNEZHAD *et al.*, 2011). As bactérias vêm sendo isoladas de ambientes contaminados por hidrocarbonetos, sugerindo e demonstrando serem estes micro-organismos promissores em projetos de biorremediação de ambientes contaminados (TAVASSOLI *et al.*, 2011). Na remoção biológica de hidrocarbonetos a partir de um ambiente contaminado, um fator importante é sua biodisponibilidade, que de modo geral, é o grau de interação ao qual um contaminante pode ser facilmente decomposto por um micro-organismo. A biodisponibilidade de um contaminante é controlada por fatores tais como o estado físico do hidrocarboneto in situ, a sua hidrofobicidade, a solubilidade em água, capacidade de sorção em matrizes ambientais, como por exemplo o solo, e difusão para fora dessas matrizes (ABBASNEZHAD *et al.*, 2011).

Diversos micro-organismos são capazes de degradar os hidrocarbonetos do petróleo, alguns são degradadores de alcanos, outros de aromáticos, e alguns conseguem metabolizar ambos (ATLAS, 1981). Biodegradação de hidrocarbonetos líquidos pouco hidrossolúveis é muitas vezes limitada pela baixa disponibilidade de substrato para o micro-organismo. Adesão de micro-organismos a uma interface óleo-água pode aumentar essa disponibilidade. A capacidade de aderir à interface não é limitada a micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, nem é o único mecanismo para permitir a absorção rápida de hidrocarbonetos, mas representa uma estratégia comum (ABBASNEZHAD *et al.*, 2011).

Abbasnezhad *et al.* (2011) relatam que a adesão de micro-organismos pode beneficiar o crescimento e a biodegradação dos hidrocarbonetos muito pouco solúveis em água tais como n-alcanos e grandes hidrocarbonetos aromáticos policíclicos dissolvidos em uma fase não aquosa. Quando os contaminantes têm uma solubilidade

muito baixa em água, como neste caso, os componentes da fase orgânica não se difundirão de forma eficiente para a fase aquosa. A adesão é particularmente importante quando os hidrocarbonetos não são emulsionados, fornecendo uma área interfacial limitada entre as duas fases líquidas. Quando comunidades mistas estão envolvidas na biodegradação, a capacidade das células de aderir à interface pode permitir o crescimento seletivo e melhorar a biorremediação com o tempo. Micro-organismos produtores de biosurfactantes facilitam essa interação entre fases aquosa e não-aquosa.

Tavassoli *et al.* (2011) realizaram um estudo específico isolando cepas microbianas que possuíam maior capacidade de biodegradar asfaltenos como *Bacillus, Brevibacillus, Staphylococcus* e *Corynebacterium.* A partir disso, afirmaram que as culturas puras consumiram menos o composto do que as culturas mistas, devido ao sinergismo entre as cepas. Essa teoria foi utilizada para justificar a aplicação de apenas um micro-organismo neste trabalho, que tem a intenção de degradar de forma parcial o asfalteno e não em consumi-lo totalmente.

## 3.5.*Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* é um micro-organismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos. Foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica*. O nome da espécie "*lipolytica*" refere-se à capacidade do micro-organismo crescer e decompor materiais hidrofóbicos (principalmente óleos e gorduras), uma vez que os habitats naturais deste micro-organismo são ambientes com alto teor de óleo, como efluentes contaminados, ou ainda, lipídios alimentícios (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Os modelos celulares mais estudados *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, são consideradas leveduras “convencionais” em relação à fisiologia, genética e biologia molecular. Portanto, *Y. lipolytica*, pertence ao grupo das leveduras “não-convencionais”, sendo a espécie mais estudada desse grupo, não apenas em pesquisas fundamentais, mas biotecnológicas (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

*Y. lipolytica* apresenta variada atividade metabólica, é considerada não patogênica, vários dos seus processos foram classificados como seguros (GRAS) pelo

*Food and Drug Administration* (FDA-EUA) (AMARAL *et al.*, 2006) e pode ser isolada a partir de substratos ricos em lipídios e proteínas (FICKERS *et al*., 2005). Atua na produção industrial de uma série de enzimas e ácidos orgânicos, como por exemplo, ácido cítrico, sendo também usada com freqüência como modelo biológico em estudos relacionados ao metabolismo lipídico, biogênese dos peroxissomos, vias de secreção em geral e diferenciação celular. *Y. lipolytica* também se tornou um modelo alternativo adequado para o estudo das transições dimórficas, uma vez que é facilmente acessível a biologia molecular e manipulação genética (KRONBERG *et al.*, 2011). Estirpes do tipo selvagem ou modificadas geneticamente de *Y. lipolytica*, podem também ser empregadas na bioconversão de alcanos e ácidos graxos, tais como na produção de aroma, para a produção de proteínas e óleo de unicelulares, em biorremediação, em química fina, para a biotransformação de esteróides e na indústria alimentícia. Estes exemplos demonstram vantagens distintas da utilização desta levedura em reações de bioconversão de substratos hidrofóbicos biotecnologicamente interessantes (FICKERS *et al*., 2005).

*Yarrowia lipolytica* é uma das leveduras mais bem relatadas na produção de lipídios-carboidratos-proteína com base bioemulsificante. Este polissacarídeo pode aumentar a hidrofobicidade das células durante a fase de crescimento e a produção extracelular de bioemulsificante quando a célula entra na fase estacionária (AMARAL *et al.*, 2006; FERREIRA, 2009; FONTES *et al.*, 2010, SATPUTE *et al.*, 2010),

### 3.5.1. Degradação de Substratos Hidrofóbicos

A capacidade da levedura *Yarrowia lipolytica* em degradar substratos hidrofóbicos está ligada à alta hidrofobicidade da superfície de parede celular, tendo ainda capacidade de produzir moléculas com propriedades tensoativas, a partir de uma ampla diversidade de fontes de carbono. Esta levedura degrada eficientemente substratos hidrofóbicos, como asfaltenos, n-alcanos, ácidos graxos, gorduras e óleos para as quais tem percursos metabólicos específicos. A interação entre as células e as superfícies ou moléculas hidrofóbicas é mediada por proteínas ou glicoproteínas da parede celular (AMARAL *et al.*, 2006; AMARAL, 2007; BANKAR *et al.*, 2009; FERREIRA, 2009; FONTES *et al.*, 2010; KAR *et al.*, 2011).

O catabolismo de substratos hidrofóbicos nas leveduras, como em *Yarrowia lipolytica*, é um metabolismo muito complexo que envolve várias vias metabólicas ocorrendo em diferentes compartimentos celulares, como mostrado resumidamente na Figura 3.8 (FICKERS *et al*., 2005).

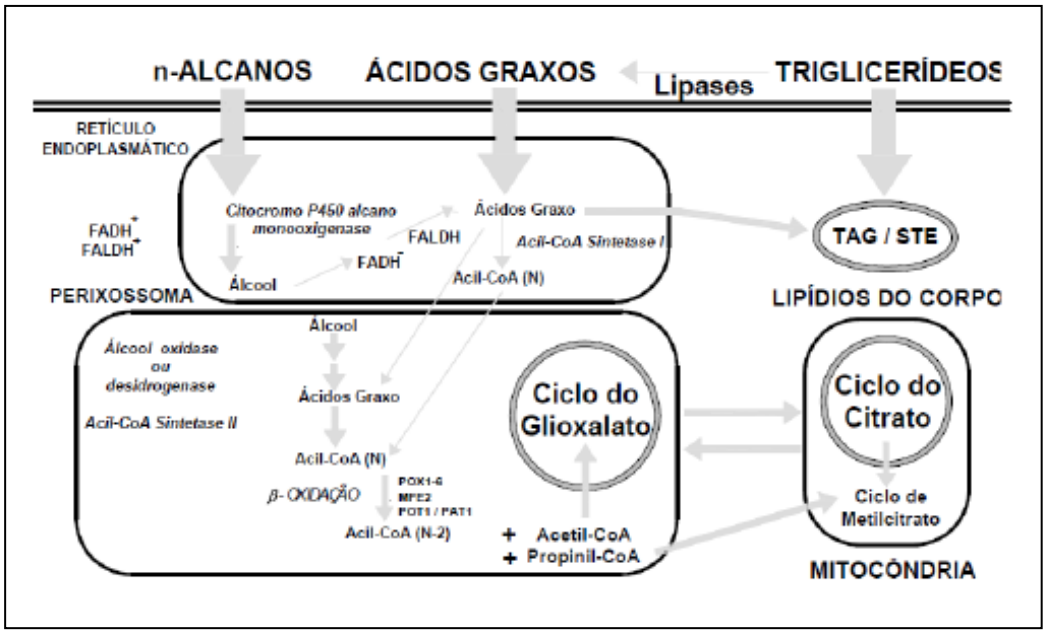



Figura 3.8: Principais vias metabólicas e compartimentos celulares envolvidos na degradação de substratos hidrofóbicos (adaptado de FICKERS *et al*., 2005).

Os triglicerídeos são primeiramente hidrolisados por enzimas lipolíticas em ácidos graxos livres, que então, conseguem penetrar na célula, enquanto que os alcanos entram diretamente. A primeira oxidação dos alcanos em seu álcool correspondente ocorre no retículo endoplasmático pelo citocromo P450 alcano monooxigenase, sendo este posteriormente convertido em seu ácido graxo correspondente por dois passos. Os ácidos graxos são então ativados no retículo endoplasmático, no peroxissoma, antes de entrar na via da β-oxidação dos ácidos graxos, que resulta em acetil-CoA e propionil-CoA (no caso de alcanos de cadeias ímpares). Dependendo das condições ambientais, as células podem armazenar os ácidos graxos diretamente. Os intermediários metabólicos produzidos na β-oxidação entram no ciclo do glioxalato, o qual interage com o ciclo do ácido cítrico e o ciclo de metilcitrato na mitocôndria.

Uma característica importante na utilização dos alcanos por leveduras é o fluxo metabólico de carbono para a síntese de todos os componentes celulares por meio de

ácidos graxos, o que é bastante diferente do caso de substratos convencionais como hidratos de carbono. Três etapas enzimáticas estão envolvidas na bioconversão de n-alcanos como pode ser observado na Figura 3.9: catálise pela citocromo P450 alcano monooxigenase situado no retículo endoplasmático; ação da enzima álcool desidrogenase, e em seguida, para formação do ácido; e, ao final, a ação da enzima aldeído desidrogenase presente no perixossoma (FICKERS *et al.*, 2005).

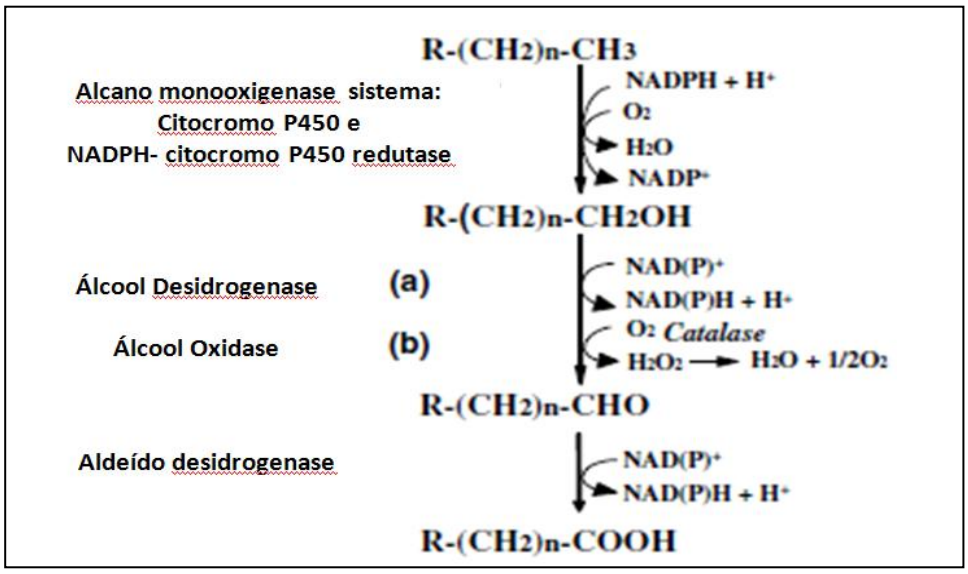



Figura 3.9: Etapas de oxidação primária de alcanos. (adaptado de FICKERS *et al.*, 2005).

A assimilação de substratos hidrofóbicos pode ocorrer através de adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pode ser mediada por um surfactante. Para estudar os mecanismos de interação entre as células e a fase hidrofóbica é necessário analisar as propriedades de superfície de ambos. Certamente, as propriedades de superfície dos micro-organismos dependem da espécie utilizada, do ambiente que a cerca e da fonte de carbono presente no meio. Como a produção de agentes emulsionantes pelo microrganismo também pode interferir nas interações, é importante que se investigue a possível excreção de tais compostos no meio de cultivo. (FERREIRA, 2009).

Segundo Amaral (2007), a interação entre as células e as superfícies ou compostos hidrofóbicos parece ser mediado por proteínas ou glicoproteínas da parede celular. Além disso, as interações observadas entre as células e solventes apolares estão ligadas às interações apolares ou ligações de *van der Waals*.

### 3.5.2. Capacidade de Degradação do Petróleo

Zinjarde e Pant (2002) constataram que alguns micro-organismos de ambiente marinho tropical, dentre eles bactérias e leveduras, são capazes de degradar óleo cru. As estirpes de leveduras se mostraram importantes degradadoras das frações alifáticas. Através de testes bioquímicos foram identificadas e observaram que todas pertenciam ao gênero *Candida*. *Y. lipolytica* foi a que apresentou melhor capacidade degradadora utilizando 78% da fração alifática do óleo cru.

Ferreira (2009) empregou a levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, isolada da água de um estuário tropical no Rio de Janeiro – Brasil, em meio contendo óleo cru a fim de avaliar sua real capacidade de biodegradação em casos de derramamento de petróleo. O experimento foi realizado mediante um planejamento experimental tendo como variáveis independentes a temperatura, a agitação, a quantidade de petróleo e concentração do inóculo. Quando analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas foi observado degradação de compostos do petróleo, tanto frações leves quanto pesadas. Portanto, pôde-se afirmar que a levedura tem potencial para aplicabilidade em processos de degradação de óleo cru, se mostrando eficiente na degradação de hidrocarbonetos.

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1. Materiais

### 4.1.1. Reagentes

Para o preparo dos meios de cultivos foram utilizados os seguintes componentes: peptona (Vetec-Brasil), extrato de lêvedo (Vetec-Brasil), glicose (Vetec-Brasil), agar-agar (Vetec-Brasil), $KH_2PO_4$ (Vetec-Brasil), $Na_2HPO_4$ (Vetec-Brasil), $MgSO_4.7H_2O$ (Vetec-Brasil), $CaCl_2$ (Vetec-Brasil), $FeCl_3.6H_2O$ (Vetec-Brasil), $ZnSO_4$. $7H_2O$ (Vetec-Brasil), $ZnSO_4.H_2O$ (Vetec-Brasil).

Os reagentes utilizados na extração dos asfaltenos foram tolueno P.A. (Vetec-Brasil), N-heptano P.A. (Vetec- Brasil) e clorofórmio P.A. (Vetec- Brasil).

Os reagentes utilizados para estudo de influência de solventes foram acetofenona (Vetec- Brasil), tetrahidrofurano (Vetec- Brasil) e tolueno P.A. (Vetec- Brasil).

Como fonte de carbono foi utilizada glicose (Vetec-Brasil).

A coluna cromatográfica foi preparada com sílica *Silia Flash G60* (Silicycle). Durante o procedimento foram usado como solventes orgânicos hexano (Vetec-Brasil) e diclorometano (Vetec-Brasil).

### 4.1.2 Equipamentos

Balança analítica Ohaus modelo *Adventurer™ AR2140*

Capela de fluxo laminar *BioFlux II 90A*;

Capela de exaustão Quimis

Cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama Perkin Elmer modelo *Clarus 400*

Cromatógrafo por permeação em gel da *Waters* (*515HPLC Pump*)

Destilador Fisatom modelo *534*

Espectrofotômetro Shimadzu

Espectrofotômetro Bel Photonic *SP2000-UV*

Estufa Quimis modelo *Q317M-32*

Incubador rotatório (shaker) *Certomat BS-1*

Mufla Provecto Analítica modelo *MFL* 1000;

Rotaevaporador *IKA*

Vortex *IKA* modelo *MS2*

### 4.1.3. Petróleo

Os óleos crus utilizados para extração dos asfaltenos foram gentilmente cedidos pela Petrobras SA, possuindo características conformacionais diferentes. O denominado petróleo A apresenta predominantemente asfaltenos com estrutura de modelo arquipélago, e o petróleo B, modelo continental, cujas características foram determinadas por Lima (2008) e são encontradas nas Tabelas 4.1 a 4.3.

Tabela 4.1: Composição química dos petróleos A e B (LIMA, 2008).

| **SARA (%m/m)** | **Petróleo A** | **Petróleo B** |
|---|---|---|
| Saturados | 44,9 | 40,2 |
| Aromáticos | 29,0 | 32,2 |
| Resinas | 23,5 | 24,3 |
| Asfaltenos | 2,6 | 3,2 |

Tabela 4.2: Viscosidade dos petróleos A e B em função da temperatura (LIMA, 2008).

| **Temperatura (ºC)** | **Viscosidade (cP)** | |
|---|---|---|
| | **Petróleo A** | **Petróleo B** |
| 30 | 1847,4 | 193,0 |
| 40 | 1324,1 | 160,0 |
| 60 | 310,0 | 61,0 |

Tabela.4.3: Teor de água dos petróleos A e B determinado por Karl Fischer segundo ASTM D4377-00 (LIMA, 2008).

| **Karl Fischer** | **Petróleo A** | **Petróleo B** |
|---|---|---|
| Teor de Água (%) | 12,65 ± 0,20 | 0,82 ± 0,05 |

### 4.1.4. Meios de Cultivo

- Meio YPD (*Yeast Extract, Peptone, Dextrose*): extrato de lêvedo 1% p/v, peptona 2% p/v e glicose 2% p/v

- Meio Mineral (g/L): $KH_2PO_4$, 7; $Na_2HPO_4$, 2,5; $MgSO_4.7H_2O$, 1,5; $CaCl_2$, 0,15; $FeCl_3.6H_2O$, 0,15; $ZnSO_4.7H_2O$, 0,02; $MnSO_4.H_2O$, 0,06 (PAPANIKOLAOU *et al*., 2002).

### 4.1.5. Micro-organismo

A levedura empregada foi *Yarrowia lipolytica* 583 IMUFRJ 50682, uma cepa selvagem selecionada de um estuário da Baía de Guanabara, RJ (HAEGLER e MENDONÇA–HAEGLER, 1981), isolada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O aspecto microscópio pode ser visualizado na Figura 4.1.

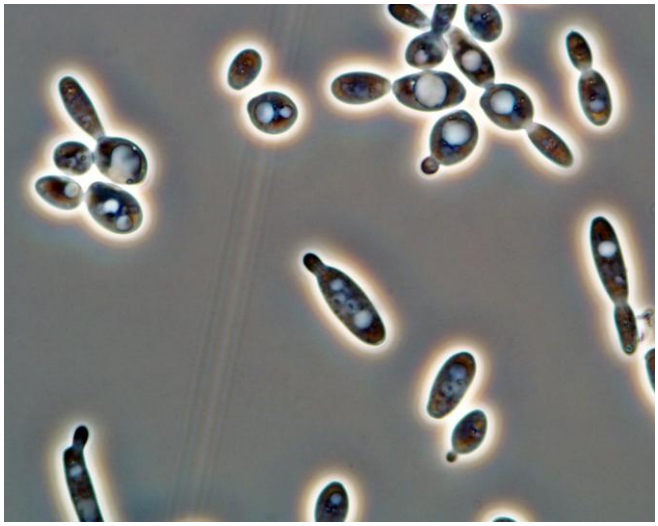


Figura 4.1: Observação microscópica da levedura *Yarrowia lipolytica* durante o crescimento em glicerol. (http://www.ufz.de/index.php?de=17937/)

## 4.2. Metodologias

### 4.2.1. Esterilização

Todo meio de cultivo, assim como o material utilizado para manuseio da levedura *Yarrowia lipolytica* foram previamente esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 20 minutos.

### 4.2.2. Manutenção da cultura

A conservação das células se deu a 4ºC após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio YPD (*Yeast Extract, Peptone, Dextrose*) sólido contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e agar 2%.

### 4.2.3. Inóculo

O inóculo foi obtido a partir da cultura crescida em meio sólido YPD mantida em tubos de ensaio. Em ambiente estéril, com o auxílio de uma alça de platina estéril, inoculou-se as células em 100mL de meio líquido YPD em erlenmeyers de 500mL. Após o crescimento por 48 horas em um incubador rotatório a 28ºC a 160rpm foi realizada a leitura da absorvância (570nm) de uma alíquota deste cultivo. A amostra foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com água destilada estéril. Novamente foram centrifugadas e após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio mineral estéril, sendo empregadas nos experimentos que serão descritos nos próximos itens.

### 4.2.4. Extração dos Asfaltenos

A extração dos asfaltenos foi realizada seguindo a metodologia baseada na norma ASTM 6560-00, ensaio padronizado pelo *Institute of Petroleum of London* – (*Standard Methods for Analysis and Testing of Petroleum and Related Products* – vol.1 IP 143), conforme pode ser observada na Figura 4.2.

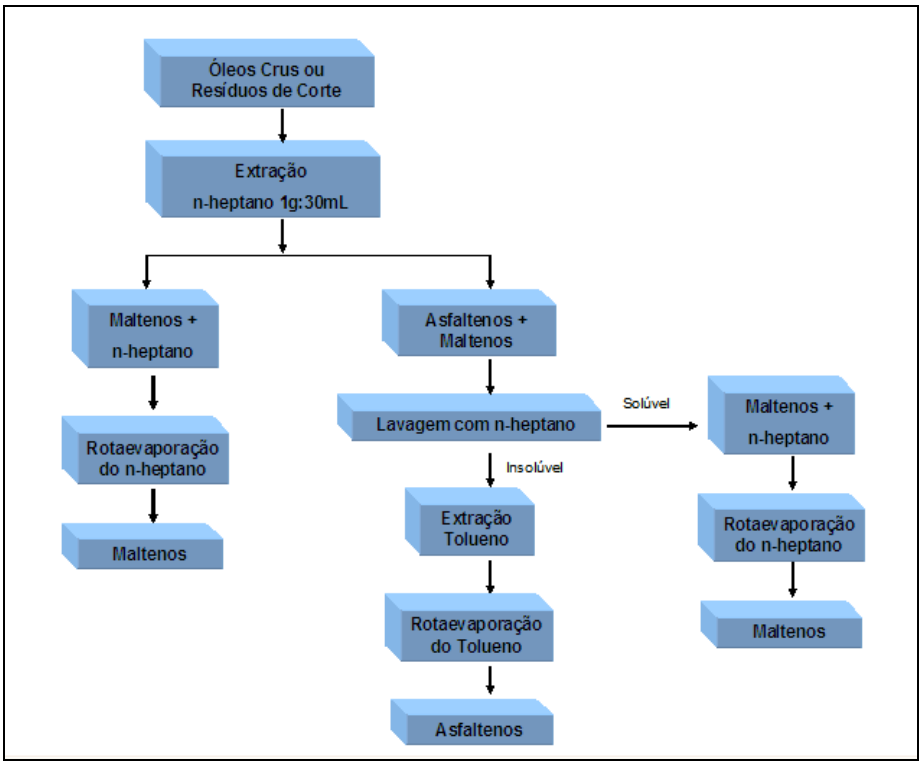



Figura 4.2: Método de extração e quantificação do teor de asfaltenos segundo ASTM 6560-00.

Para a técnica de obtenção do asfalteno foi necessário que o balão utilizado estivesse limpo e levado previamente a peso constante. Após homogeneização do óleo cru, foram pesados 10g em cada balão de fundo chato e acrescidos 300mL de n-heptano. Colocou-se três pérolas de vidro em cada balão, evitando assim, projeção do líquido com aquecimento. O balão foi acoplado a um condensador sobre uma placa de aquecimento. Logo iniciada a ebulição do líquido, o sistema foi mantido em refluxo em por 60 minutos. Ao resfriar, o balão foi tampado e transportado para um local escuro onde permaneceu por 90 minutos. Ao término deste período, filtrou-se à vácuo o conteúdo do balão com papel filtro (marca Whatman nº42). O papel filtro foi colocado em um extrator, e o balão, denominado balão original, foi reservado para posterior utilização. Em outro balão de fundo chato, denominado balão de lavagem, verteu-se 100mL de n-heptano. Este foi acoplado ao extrator contendo o filtro e logo adaptado ao sistema com o condensador e a placa de aquecimento. A amostra foi retirada, quando o solvente de lavagem gotejou totalmente límpido sobre o papel filtro, considerando que todo resíduo tinha sido extraído. Em seguida, para extrair o asfalteno, foram

adicionados 60mL de tolueno nos balões originais reservados, mantendo o mesmo papel filtro em refluxo. O sistema foi desligado quando observou-se que o solvente gotejava transparente, um indicativo de que o asfalteno já tinha sido extraído. Então, o balão foi colocado em um rotaevaporador para remoção do tolueno, restando apenas uma fina camada sólida. Transportou-se esse balão para a estufa, garantindo assim, evaporação completa do solvente. O sólido raspado da parede do balão foi o asfalteno utilizado nos experimentos posteriores, conforme ilustrado na Figura 4.3.

Figura 4.3: Asfalteno obtido após extração segundo ASTM 6560-00.

### 4.2.5. Experimentos Preliminares

A fim de estudar a capacidade da levedura *Yarrowia lipolytica* na biodegradação dos asfaltenos provenientes dos petróleos A e B e sua ação frente a diferentes concentrações destes asfaltenos, foram desenvolvidos experimentos preliminares.

Os experimentos foram realizados em duplicata em erlenmeyers de 250mL contendo 50mL de meio mineral e uma concentração celular inicial de 1,0 mg p.s./mL. Experimento controle, i.e. sem asfalteno, foram realizados para um comparativo permanecendo em shaker nas condições de 160rpm a 28ºC por 96 horas. A Tabela 4.4 e 4.5 resumem os experimentos realizados. Diariamente foram retiradas alíquotas para as análises do crescimento microbiano realizadas em espectrofotômetro a 570nm e correlacionadas ao peso seco de células através de curva-padrão.

Tabela 4.4: Experimento preliminar I

| Experimentos | Asfalteno A | Asfalteno B | Glicose |
|---|---|---|---|
| 1 | 2g/L | - | - |
| 2 | - | 2g/L | - |
| 3 | - | - | 2g/L |

Tabela 4.5: Experimento preliminar II

| Experimentos | Asfalteno A |
|---|---|
| 4 | 2g/L |
| 5 | 10g/L |

### 4.2.6. Experimentos controle

Os experimentos controle foram realizados como comparativo do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* na ausência de asfalteno, sendo adicionado 2% de glicose como fonte de carbono em substituição ao asfalteno. Este foi conduzido nas mesmas condições dos experimentos preliminares.

### 4.2.7. Estudo da Influência de Solventes Orgânicos no Crescimento Celular da levedura *Yarrowia lipolytica*

A adição de solventes orgânicos no processo de biodegradação por *Yarrowia lipolytica* teve como proposta obter uma melhor homogeneização do asfalteno, substância com característica hidrofóbica, em meio mineral aquoso. Esse estudo verificou a influência dos solventes orgânicos acetofenona, tetrahidrofurano e tolueno no processo catalisado por *Y. lipolytica* em condições de temperatura e agitação constantes.

O experimento foi realizado em erlenmeyers de 250mL contendo 50mL de meio mineral, com concentração celular inicial de 1,0 mg p.s./mL de meio de cultivo por peso seco de células. Adicionou-se 100mg de asfalteno dissolvido em 5% de acetofenona. O

mesmo foi realizado para os solventes orgânicos tetrahidrofurano e tolueno. Também foram conduzidos experimentos controle com ausência de asfalteno e presença dos solventes orgânicos para que fosse verificada o grau de toxicidade à levedura. Os experimentos foram realizados sob agitação de 160 rpm no shaker a 28ºC, por um período de 96 horas. Analisou-se o crescimento microbiano realizando leituras diárias da densidade ótica de 570nm, correlacionada ao peso seco de células através de curva-padrão.

### 4.2.8. Planejamento Experimental

Realizou-se um estudo das variáveis que possivelmente poderiam influenciar no processo de biodegradação parcial de asfaltenos por *Yarrowia lipolytica*. As variáveis independentes consideradas foram agitação, quantidade inicial de asfalteno adicionada e a concentração celular inicial, conforme mostrado na Tabela 4.6. O planejamento fatorial aplicado foi $2^3$, onde seis pontos foram axiais e três pontos centrais. O software empregado foi *Design Expert*® que gerou um planejamento experimental (Tabela 4.7) a ser desenvolvido no decorrer dos experimentos, que foram realizados de forma aleatória. Os valores de α foram alterados para que se obtivessem valores reais controláveis de acordo com as condições do processo. Esse planejamento foi aplicado para os experimentos contendo tanto asfaltenos de modelo predominantemente arquipélago quanto para asfaltenos de modelo continental.

Tabela 4.6: Variáveis e níveis analisados no planejamento experimental

| **Variáveis** | **Níveis** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **-2** | **-1** | **0** | **+1** | **+2** |
| Rotação (rpm) | 70 | 115 | 160 | 205 | 250 |
| Asfalteno (mg) | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| Inóculo (mg/mL) | 0,1 | 0,55 | 1,0 | 1,45 | 1,9 |

Tabela 4.7: Experimentos realizados segundo planejamento experimental

| Ensaios | Agitação (rpm) | Asfalteno (g) | Inóculo (mg/mL) |
|---|---|---|---|
| **01** | -1 | -1 | -1 |
| **02** | +1 | -1 | -1 |
| **03** | -1 | +1 | -1 |
| **04** | +1 | +1 | -1 |
| **05** | -1 | -1 | +1 |
| **06** | +1 | -1 | +1 |
| **07** | -1 | +1 | +1 |
| **08** | +1 | +1 | +1 |
| **09** | -2 | 0 | 0 |
| **10** | +2 | 0 | 0 |
| **11** | 0 | -2 | 0 |
| **12** | 0 | +2 | 0 |
| **13** | 0 | 0 | -2 |
| **14** | 0 | 0 | +2 |
| **15** | 0 | 0 | 0 |
| **16** | 0 | 0 | 0 |
| **17** | 0 | 0 | 0 |

### 4.2.9. Extração das Amostras após Biodegradação pela *Yarrowia lipolytica*

Garantindo através de estudos preliminares que a célula estaria em fase estacionária, realizou-se a extração líquido-líquido após decorrido o período de 168h. O experimento foi retirado do shaker e transferido para um funil de decantação onde foi realizado o processo de separação da fase orgânica utilizando como solvente orgânico clorofórmio. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica reservada para análises posteriores.

### 4.2.10. Tratamento das Amostras Extraídas

A coluna cromatográfica foi montada seguindo a norma baseada no método EPA 3630C. A sílica utilizada foi previamente tratada a 400ºC por duas horas na mufla, para garantir que não haveria qualquer tipo de interferente presente na mesma. Posteriormente, foi transferida para a estufa para ser ativada a 150ºC por uma hora. Ao final, aguardou-se o resfriamento da sílica ativada no dessecador em temperatura ambiente, evitando assim, reabsorção de umidade.

Para preparo da coluna cromatográfica (Figura 4.4) foi colocado algodão em pequena proporção para cobrir apenas o fundo (a saída). Pesou-se 10g de sílica ativada que foi transferida para a coluna. Verteu-se hexano em quantidade suficiente para umedecer e assentar a sílica. Foi incorporado 1mL da amostra em cima da sílica seguido de 50mL de hexano, adquirindo ao final da corrida, a fração de saturados que foi separada para análise posterior. O processo foi continuado adicionando-se 50mL de solução de hexano com diclorometano em diluição 1:1 sobre a sílica. Após a corrida foi retirada a fração de aromáticos. Ambas as frações extraídas foram encaminhadas ao rotaevaporador até total evaporação dos solventes e ressuspensas em 200µL de diclorometano. Foram transferidas para um *vial* com *insert* e analisadas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas.

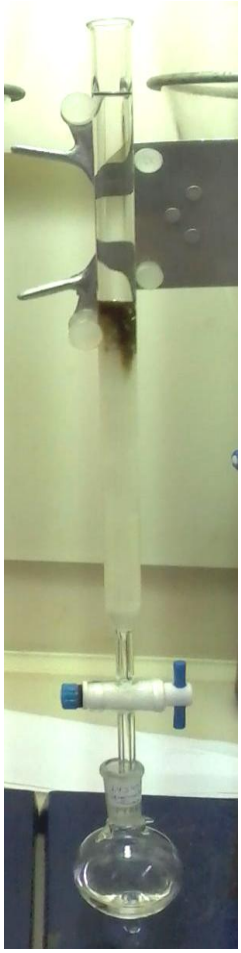


Figura 4.4: Coluna cromatográfica

## 4.3. Métodos Analíticos

### 4.3.1. Análise de Crescimento Celular de *Yarrowia lipolytica*

Para acompanhamento do crescimento celular da levedura *Yarrowia lipolytica* retirou-se uma alíquota diária que foi submetida à determinação da absorvância em espectrofotômetro BEL a 570nm. Esses valores de absorvância foram convertidos para mg p.s. cél/mL utilizando o fator de conversão obtido pela curva de peso seco, conforme mostrado na Figura 4.5. A partir de uma suspensão de células em solução aquosa, retira-se uma amostra (20 mL), que é filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 µm), seca em luz de infravermelho, até peso constante. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições de modo a obter concentrações celulares distintas e, então, o valor de absorvância para cada concentração é obtida em espectrofotômetro a 570nm.

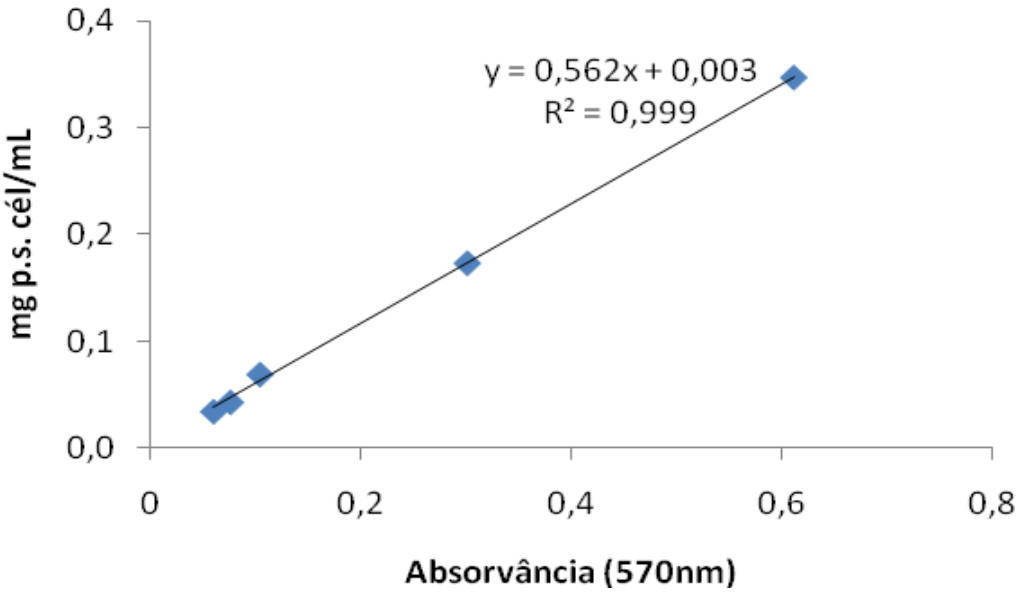



Figura 4.5: Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Y. lipolytica* através de medida de absorvância em espectrofotômetro BEL.

### 4.3.2. Análise de Biodegradação por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC – *Gel Permeation Chromatography*)

As amostras dos asfaltenos A e B após processo de biodegradação por *Yarrowia lipolytica* foram analisadas por metodologia utilizando GPC. Para tal foi empregue um cromatógrafo com detector de índice de refração *Waters* 2414 e bomba *Waters* 515 HPLC. Foi utilizado um conjunto de três colunas *Ultrastyragel da Waters* uma de 500A seguida de duas lineares. Foi utilizado tetrahidrofurano (THF) como fase móvel e como solvente para solubilização da amostra. A vazão do fluxo foi de 1mL/min. O padrão utilizado para a construção de curvas de calibração foi o padrão de poliestireno. Todas as soluções foram filtradas em membranas de acetato de celulose de tamanho de poro 0,22µm antes da injeção.

Essas análises foram gentilmente realizadas pelo Instituto de Macromoléculas da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### 4.3.3 Análise de Biodegradação por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chamas (GC-FID – *Gas Chromatography - Flame Ionization Detector*)

Depois de submetidas ao processo de biodegração por *Y. lipolytica* as amostras dos asfaltenos A e B foram previamente fracionadas pela coluna cromatográfica: fração de saturados e fração de aromáticos, conforme descrito no item 4.2.10. Para caracterizar essas amostras foram realizadas leituras em GC-FID Perkin Elmer modelo *Clarus 400* (Figura 4.6). O equipamento utilizado possuía coluna capilar *Hewlett-Packard* 5MS Agilent J&W Ultra Inert (30m; 0,25mm d.i.; 0,25µm de espessura do filme) equipado com amostrador automático e injetor split (razão 15:1). A faixa de temperatura foi de -60ºC a 325/ 350ºC. O *software* usado foi o Totalcrhrom. As amostras injetadas eram diluídas em diclorometano.

A identificação dos picos foi realizada através de comparação do tempo de retenção das amostras com os padrões e por cromatografia e a quantificação por padronização interna, utilizando como padrão interno p-Terfenil.

Essas amostras foram gentilmente analisadas no Laboratório Quality Lab Brasil.

Figura 4.6: Equipamento de Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama Perkin Elmer modelo *Clarus 400*

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1. Experimentos Preliminares

Os experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de analisar se a levedura *Yarrowia lipolytica* apresentaria algum crescimento em meio contendo como única fonte de carbono e energia o asfalteno. A Figura 5.1 mostra que a concentração celular inicial corresponde a uma densidade ótica (a 570nm) de 0,30. Ao atingir 96 horas de experimento, esse valor chegou a aproximadamente 0,50 tanto na amostra contendo asfalteno A (modelo predominantemente arquipélago) quanto no asfalteno B (modelo continental).

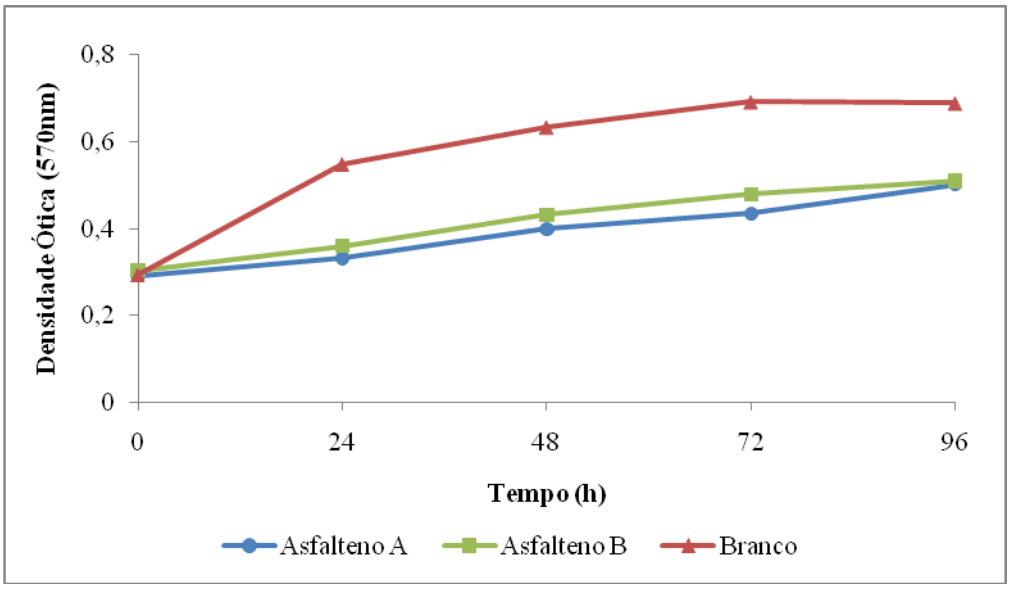



Figura 5.1: Crescimento microbiano de *Y. lipolytica.* em meio de cultivo cotendo 100mg de asfaltenos como fonte de carbono. O branco foi preparado tendo glicose 2% como fonte de carbono. A barra de erro corresponde ao desvio padrão da análise.

Esses resultados comprovam que a levedura realmente foi capaz de se desenvolver em meio contendo ambos os tipos de asfaltenos (A e B) como única fonte de carbono. Alguns trabalhos já relataram que os micro-organismos são capazes de utilizar óleo cru como única fonte de carbono, como Ferreira (2009). Mesmo a superfície das células de *Y. lipolytica* 583 IMUFRJ 50682 sendo caracterizadas como

hidrofílicas, apresentam alta afinidade com moléculas hidrofóbicas quando imersas na água (AMARAL, 2006). Portanto, Ferreira (2009) afirma que a fonte de carbono influencia a composição da parede celular e, portanto, influencia os componentes responsáveis pela hidrofobicidade celular da levedura.

Tavassoli *et al.* (2011) concluiram que a concentração do asfalteno é um interferente relevante na biodegração. Portanto, também foi testado o comportamento da levedura frente a diferentes concentrações de asfalteno conforme visualizado na Figura 5.2.

Devido as características hidrofóbicas da membrana celular de *Y. lipolytica*, esta possui uma tendência a se deslocar para a fase orgânica em meios bifásicos, proporcionando uma adesão das células ao composto hidrofóbico, resultando assim, em uma variação na concentração celular (AMARAL, 2006; FERREIRA, 2009).

Foi observado que quanto maior a quantidade de asfalteno utilizada, maior a concentração celular confirmando que a levedura se utilizou realmente desta fonte de carbono, altamente aromática, sem provocar inibição no crescimento e fornecendo um pico em 72 horas. Analisou-se apenas o asfalteno A, pois o objetivo deste experimento foi avaliar se a quantidade de asfalteno, independentemente de sua composição química, poderia ser considerada uma variável importante durante o processo.

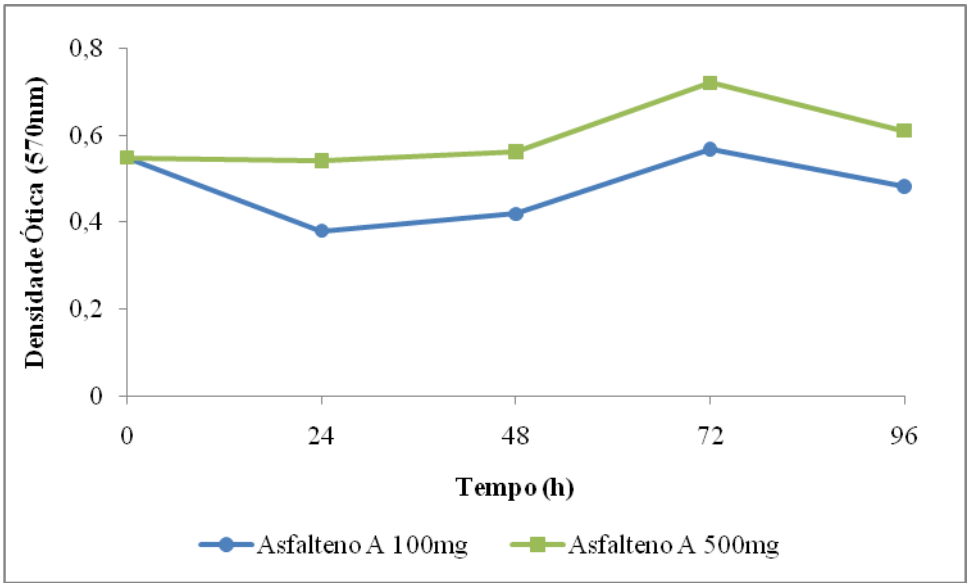



Figura 5.2: Influência da quantidade de asfalteno no crescimento microbiano de *Y. lipolytica* utilizando 100mg e 500mg de asfalteno. A barra de erro corresponde ao desvio padrão da análise.

## 5.2. Estudo da Influência de Solventes Orgânicos no Crescimento Celular da levedura *Yarrowia lipolytica*

A homogeneização do asfalteno, em meio de cultivo mineral inoculado com *Y. lipolytica*, foi dificultada devido às suas características hidrofóbicas. A avaliação da presença de solventes foi usada como estratégia na tentativa de uma maior solubilização da fonte carbono na fase aquosa, a fim de se observar se a presença de um solvente promoveria uma maior interação e facilitaria o desenvolvimento da levedura

Os solventes que apresentaram maior capacidade de solubilização do asfalteno em menor quantidade do mesmo foram: acetofenona (ACF), tetrahidrofurano (THF) e tolueno (TOL) sendo, por isso, escolhidos para este teste. Lu *et al.* (2008) confirmaram a empregabilidade de tetrahidrofurano em meios heterogêneos por dissolver-se tanto em água quanto em solventes orgânicos.

Segundo resultados obtidos por Fukumaki *et al.* (1994), *Y. lipolytica* é capaz de degradar n-alcanos na presença de solventes orgânicos. Assim, o primeiro experimento foi feito para observar o crescimento microbiano da levedura sob a influência dos três solventes orgânicos utilizando como fonte de carbono glicose 2% (Figura 5.3).

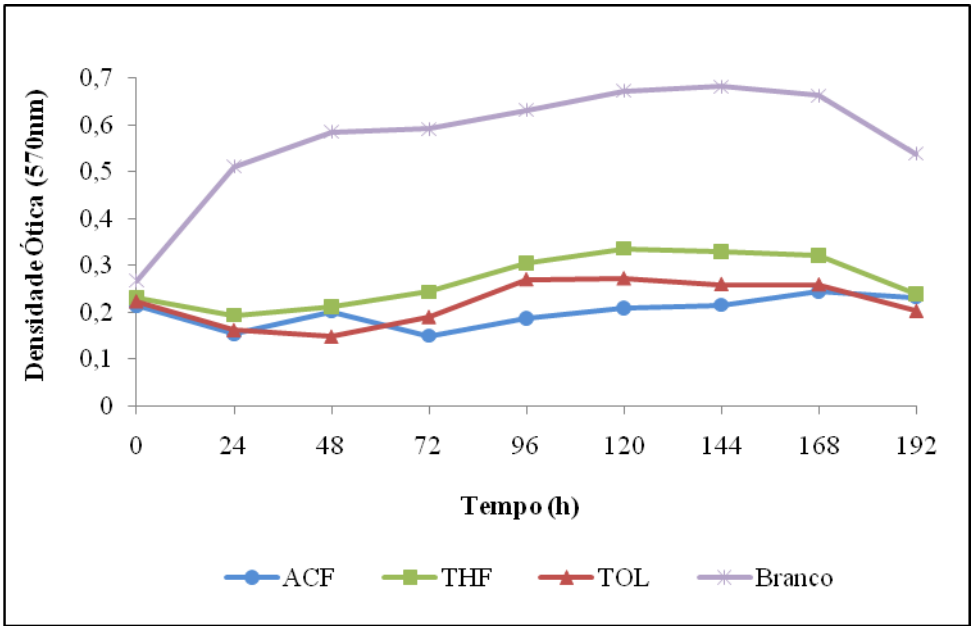



Figura 5.3: Influência de solventes orgânicos no crescimento celular de *Y. lipolytica*, usando como fonte de carbono glicose 2%. O controle foi preparado na ausência de solventes. A barra de erro corresponde ao desvio padrão da análise.

Após decorrido o período de 24 horas pode-se observar o decréscimo na concentração de células de *Yarrowia lipolytica* nos três experimentos com solventes, obtendo valores de densidade ótica bem próximos (ACF = 0,153; THF = 0,193; TOL = 0,161). Enquanto que, no mesmo ponto, o controle apresentou um aumento de aproximadamente três vezes (DO = 0,511) em relação aos demais, provando que os solventes influenciam consideravelmente de forma negativa no crescimento da levedura.

Comparando o sistema controle com àqueles que continham solventes, pode-se concluir que, de um modo geral, o tetrahidrofurano foi o que menos prejudicou o crescimento da levedura. O sistema controle apresenta o dobro da concentração celular que experimento com tetrahidrofurano em alguns pontos, como por exemplo, a 120 horas (THF = 0,335; Branco = 0,672). E com os demais solventes, essa diferença é ainda maior. A 72 horas, o controle possui um valor de densidade ótica três vezes maior (DO = 0,591) que nos sistemas com acetofenona (DO = 0,149) e tolueno (DO = 0,189).

No entanto, Lu *et al.* (2008) descreveram que o solvente orgânico tetrahidrofurano, além de não ser facilmente biodegradável, pode ter efeitos tóxicos aos organismos dos ambientes devido ao seu caráter solvente e como inibidor sobre enzimas dependentes do citocromo P450.

Yao *et al.* (2012) também confirmaram a toxicidade de THF sobre a atividade enzimática em processos biológicos, garantindo que mesmo em baixa concentração este composto tem um impacto negativo, inibindo significativamente a atividade microbiana e diminuindo gradualmente a diversidade da população bacteriana.

Paralelamente, foi realizado o mesmo experimento adicionando asfalteno, produto de interesse a ser biodegradado, como fonte de carbono. As análises diárias do crescimento microbiano foram plotadas na Figura 5.4 e 5.5. Analisando os resultados nota-se uma diminuição nas primeiras 24 horas em todos os sistemas avaliados. A partir deste período de adaptação, os experimentos com THF apresentaram crescimento gradual da levedura. No caso do asfalteno A, o crescimento em THF em 168 horas para de ser crescente, diferentemente do asfalteno B no qual após as 144 horas, começa a ser observado decréscimo neste valor, possivelmente decorrente das especificidades dos diferentes compostos presentes e dos produtos gerados em cada caso.

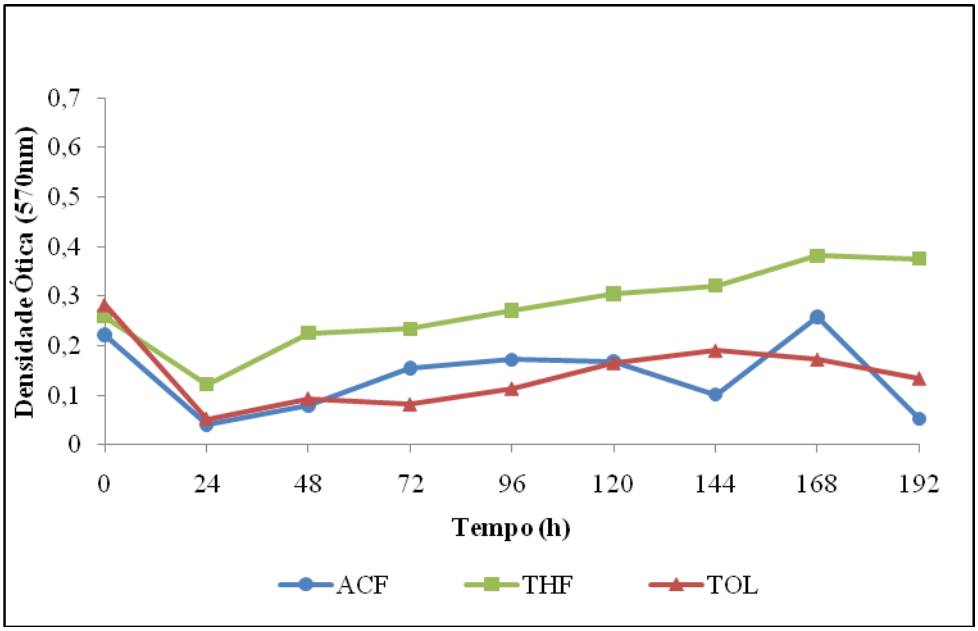



Figura 5.4: Crescimento celular de *Y. lipolytica* na presença dos solventes orgânicos, usando como fonte de carbono asfalteno A. A barra de erro corresponde ao desvio padrão da análise.

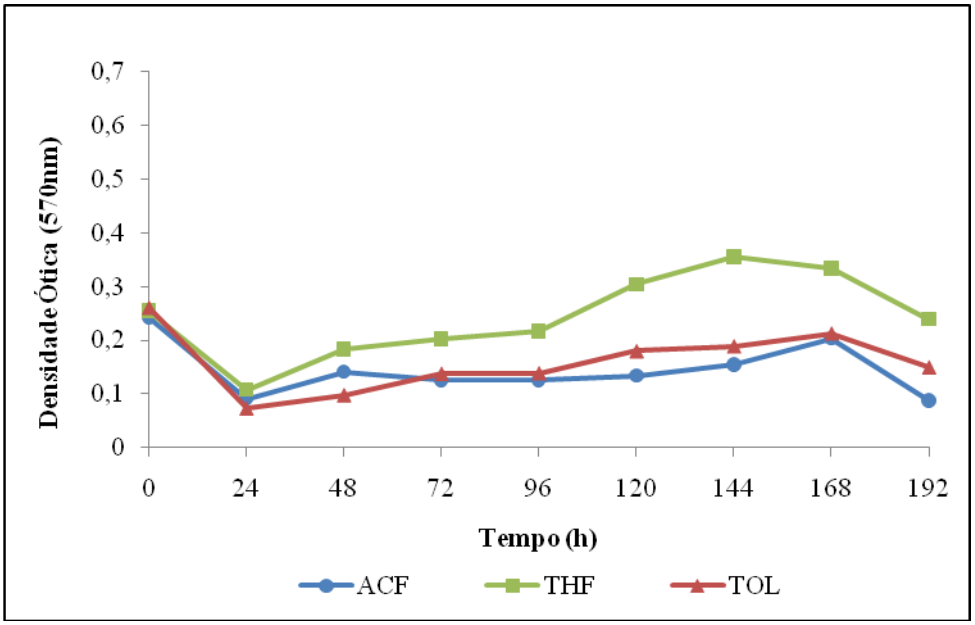



Figura 5.5: Crescimentocelular de *Y. lipolytica* na presença dos solventes orgânicos, usando como fonte de carbono asfalteno B. A barra de erro corresponde ao desvio padrão da análise.

Comparando as Figuras 5.3, 5.4 e 5.5, constata-se que o crescimento microbiano apresentou-se com perfis de crescimento similares, independente do solvente orgânico

adicionado junto à fonte de carbono utilizada. Por exemplo, o experimento contendo acetofenona adicionado ao asfalteno possui valores próximos de densidade ótica a 570nm, aos valores obtidos quando usa-se o tolueno. Se fizermos uma análise aprofundada, observamos nas Figuras 5.4 e 5.5 que o crescimento microbiano das amostras contendo os solventes acetofenona e tolueno nas 192 horas corridas de experimento, não são superiores à densidade ótica do inóculo (DO=0,25) em nenhum ponto. Então, utilizar solvente orgânico para tentar melhorar a homogeneização do asfalteno em meio mineral não pode ser considerada uma estratégia adequada, pois além de onerar o processo, é um composto considerado tóxico ao micro-organismo.

Em se tratando de tolueno, um produto químico tóxico que não é facilmente biodegradável, Isken e De Bont (1998), relataram ser um dos solventes orgânicos que se acumula e rompe as membranas celulares. Nahar *et al.* (2000) confirmam essa teoria informando a base fisiológica de toxicidade. Afirmam ser aparentemente devido à interação de tolueno com a membrana citoplasmática, levando a perda dos cátions $Mg^{+2}$ e $Ca^{+2}$, bem como outras moléculas pequenas. Tolueno, assim como muitos outros produtos químicos tóxicos, é altamente volátil e não é facilmente solúvel em água, podendo ser utilizado para inibir o crescimento de micro-organismos.

Além disso, o asfalteno sólido manteve-se disperso no meio de cultivo aquoso, possibilitando sua utilização como fonte de carbono. Isso ocorreu devido a presença de biossurfactantes produzidos pela levedura *Yarrowia lipolytica*, conforme já mencionado por alguns autores (AMARAL *et al.*, 2006; BANKAR *et al.*, 2009; FERREIRA, 2009; FONTES *et al.*, 2010). Ferreira (2009) concluiu que a fonte de carbono utilizada influencia na produção de biossurfactantes da levedura. Segundo seus resultados a glicose e o glicerol, fontes de carbono solúveis, não favorecem a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica*. Entretanto, a presença de substratos hidrofóbicos como o óleo cru, estimulou a produção e excreção de biossurfactante. Amaral (2007) justifica que a interação entre as células e as superfícies ou compostos hidrofóbicos parece ser mediada por proteínas ou glicoproteínas da parede celular. Além disso, as interações observadas entre as células e solventes apolares estão ligadas às interações apolares ou ligações de *Van der Waals*. Essa interação entre as partículas foi claramente visualizada durante o desenvolvimento do experimento conforme mostrado na Figura 5.6.

Zinjarde e Pant (2002) também observaram essa produção de biossurfactante em meio contendo óleo cru e alcanos. Em contra partida, mostraram que essa produção não é viabilizada em substratos solúveis como glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool.

Teoria confirmada por Pareilleux (1979), que cultivou *C. lipolytica* em meio contendo glicose e este não produziu nenhum bioemulsificante, ao contrário do que aconteceu no meio contendo n-alcanos.

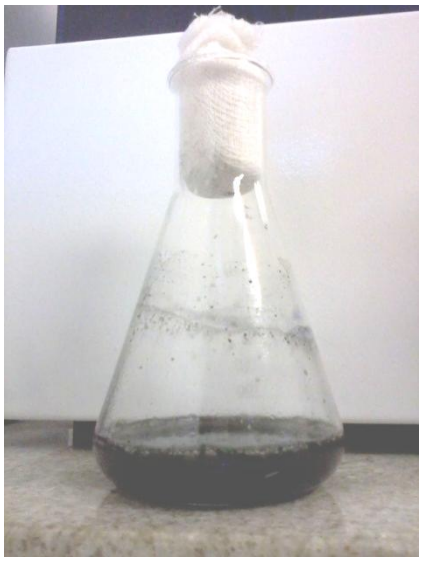


Figura 5.6: Asfalteno disperso no meio de cultivo aquoso durante os experimentos.

## 5.3. Planejamento Experimental

Foi desenvolvido um planejamento experimental com o intuito de identificar parâmetros que pudessem influenciar na ação de *Yarrowia lipolytica* como catalisadora no processo de degradação de asfaltenos de características estruturais diferentes, um modelo predominantemente arquipélago (A), e outro, continental (B). Para otimizar as condições do processo foram selecionadas três variáveis: a agitação do meio, a quantidade de asfaltenos e a quantidade de inóculo e como resposta a quantidade de hidrocarbonetos totais medida por cromatografia gasosa GC-FID. Assim, o planejamento experimental consistiu em $2^3$experimentos, acrescidos de mais 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios (Tabela 5.1) para o asfalteno A e o asfalteno B. Neste experimento, a variável de resposta foi o total de hidrocarbonetos aromáticos e saturados.

Entretanto, foi apresentado apenas o planejamento completo com os resultados obtidos a partir do asfalteno A, pois como não houve tempo hábil, a análises de

hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) das frações saturada e aromática do asfalteno B, ainda estão em andamento aguardando finalização.

Tabela 5.1: Planejamento experimental associado aos resultados obtidos na análise em GC-FID para o asfalteno A.

| **Ensaios (amostras)** | **Agitação (rpm)** | **Asfalteno (mg)** | **Inóculo (mg/ mL)** | **TPH Totais (ppm)** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | **Aromáticos** | **Saturados** |
| **01 (LYJ 17)** | 115 | 200 | 0,55 | 29,9 | 937,1 |
| **02 (LYJ 21)** | 205 | 200 | 0,55 | 15,1 | 107,8 |
| **03 (LYJ 19)** | 115 | 400 | 0,55 | 36,7 | 467,2 |
| **04 (LYJ 23)** | 205 | 400 | 0,55 | 4,0 | 186,8 |
| **05 (LYJ 25)** | 115 | 200 | 1,45 | 16,9 | 110,3 |
| **06 (LYJ 33)** | 205 | 200 | 1,45 | 9,7 | 9,4 |
| **07 (LYJ 27)** | 115 | 400 | 1,45 | 9,7 | 150,9 |
| **08 (LYJ 35)** | 205 | 400 | 1,45 | 35,2 | 106,9 |
| **09 (LYJ 41)** | 70 | 300 | 1,0 | 15,0 | 50,1 |
| **10 (LYJ 44)** | 250 | 300 | 1,0 | 72,3 | 125,0 |
| **11 (LYJ 49)** | 160 | 100 | 1,0 | 27,0 | 199,8 |
| **12 (LYJ 52)** | 160 | 500 | 1,0 | 88,1 | 369,8 |
| **13 (LYJ 37)** | 160 | 300 | 0,1 | 43,2 | 120,2 |
| **14 (LYJ 39)** | 160 | 300 | 1,9 | 20,2 | 41,8 |
| **15 (LYJ 42)** | 160 | 300 | 1,0 | 32,1 | 96,3 |
| **16 (LYJ 29)** | 160 | 300 | 1,0 | 28,4 | 519,1 |
| **17 (LYJ 30)** | 160 | 300 | 1,0 | 113,8 | 523,3 |

Um branco utilizando somente o asfalteno A bruto que não sofreu processo de degradação foi submetido ao mesmo tratamento e análise cromatográfica (Tabela 5.2). Os valores baixos encontrados neste branco podem ser explicados devido a alta complexidade das moléculas presentes no asfalteno bruto formadas por cadeias de

aromáticos policondensados dispersos em forma de coloide no petróleo, de difícil caracterização. Como o peso dos compostos presentes nessa fração é muito alto, e a técnica de cromatografia gasosa envolve a detecção de espécies vaporizadas de peso molecular muito menores, os asfaltenos não devem ser detectados quando em seu estado bruto. Assim, pode-se ter uma observação clara, em cada uma das condições testadas, de formação de produtos mais leves, gerados realmente pela ação da levedura na biodegradação do asfalteno.

Tabela 5.2: Resultados do asfalteno A bruto obtidos na análise em GC-FID.

| **Asfalteno Bruto** | **TPH Totais (ppm)** | |
|---|---|---|
| | **Aromáticos** | **Saturados** |
| **LYJ 01** | 2,9 | -5,7 |

A fração quantificada por esta técnica de GC-FID envolve moléculas de muito menor peso molecular, e possivelmente, o valor detectado de 2,9 ppm deve ser referente a alguma molécula retida quando da precipitação do asfalteno. Já para os saturados, o valor negativo encontrado na realidade envolve apenas uma correção necessária a linha de base.

Um olhar inicial sobre os resultados mostrou um maior valor de degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) com geração de maior concentração de saturados (937,1 ppm) nas menores condições empregadas de: agitação 115rpm, asfalteno 200mg e inóculo de 0,55mg/mL, como pode ser visto no ensaio 01. Enquanto que os maiores valores obtidos para a fração de aromáticos foi observado no ensaio 16 que é um ponto central, nas condições de 160 rpm de agitação, 300 mg de asfalteno e 1mg/ mL.

A análise estatística dos dados utilizando o software *Design Expert*® possibilitou a escolha do modelo mais ajustado aos dados coletados nos experimentos. Para a escolha do modelo, os parâmetros de maior importância foram os valores de: soma quadrática, Lack of Fit e coeficiente de correlação ($R^2$), apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Modelos obtidos pelo software *Design Expert®*.

| **Modelo** | **Parâmetro** | **Valor de F** | **Prob > F** | **$R^2$** |
|---|---|---|---|---|
| Linear | Soma Quadrática | 1,48 | 0,2699 | - |
| | *Lack of Fit* | 12547,7 | 0,0070 | - |
| | $R^2$ | - | - | 0,2699 |
| Quadrático | Soma Quadrática | 2,72 | 0,1370 | - |
| | *Lack of Fit* | 9469,20 | 0,0078 | - |
| | $R^2$ | - | - | 0,7496 |
| Cúbico | Soma Quadrática | 313,69 | 0,0032 | - |
| | *Lack of Fit* | 74,35 | 0,0735 | - |
| | $R^2$ | - | - | 0,9996 |

Os valores de soma quadrática foram utilizados para verificar a validade do modelo, com base no valor de F (teste de Fischer) assumindo-se uma distribuição normal e buscando um alto valor de F e prob > F menor que 0,05 (assumindo-se um intervalo de confiança de 95%).

Para os valores de *lack of fit,* que indica a falta de ajuste do modelo aos dados experimentais, procura-se os modelos que apresentam menor valor de F e prob > F maior que 0,05 assumindo-se o mesmo intervalo de confiança de 95%.

O coeficiente de correlação ($R^2$) avalia o quanto o modelo representa os dados experimentais e é calculado com base na soma de quadrados do modelo sobre a soma de quadrados total. Quanto maior o ajuste mais próximo de 1 será este valor.

Levando-se em consideração todos estes critérios de escolha determinou que o modelo cúbico era o mais adequado para representação do experimento estudado conforme pode ser observado pelos resultados apresentados na Tabela 5.3

Após esta escolha do modelo se iniciou as avaliações gráficas e de correlação usando o gráfico Box-Cox da Figura 5.7 que mostrou ser necessário fazer uma transformação na forma de utilização dos valores de resposta para uma minimização dos erros e melhor enquadramento do modelo sugerido as condições experimentais. Pelo gráfico, percebeu-se que o melhor valor seria $\lambda$=0,64 com um limite aceitável de $\lambda$ entre 0,42 e 0,86 (faixa vermelha no gráfico, sendo definida então uma transformação do tipo raiz quadrada para as respostas).

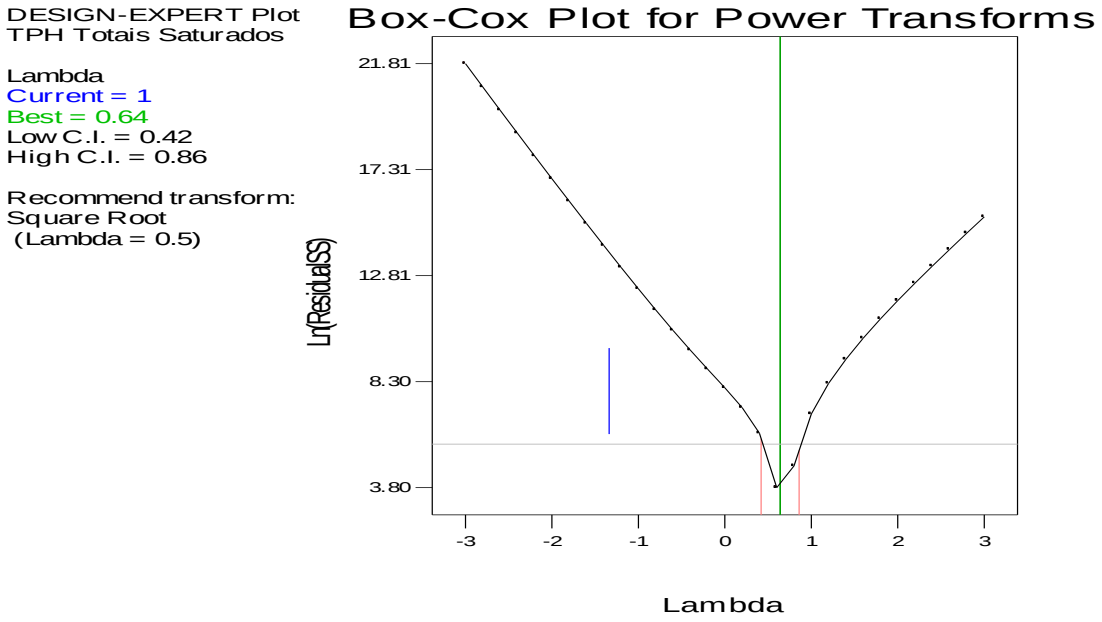



Figura 5.7: Modelo Box-Cox (TPH totais saturados) pelo software Design Expert.

A Figura 5.8 mostra o novo gráfico de Box-Cox após a transformação realizada nas respostas pela aplicação de raiz quadrada em todas elas confirmando o melhor ajuste do modelo aos dados experimentais apresentados desta forma.

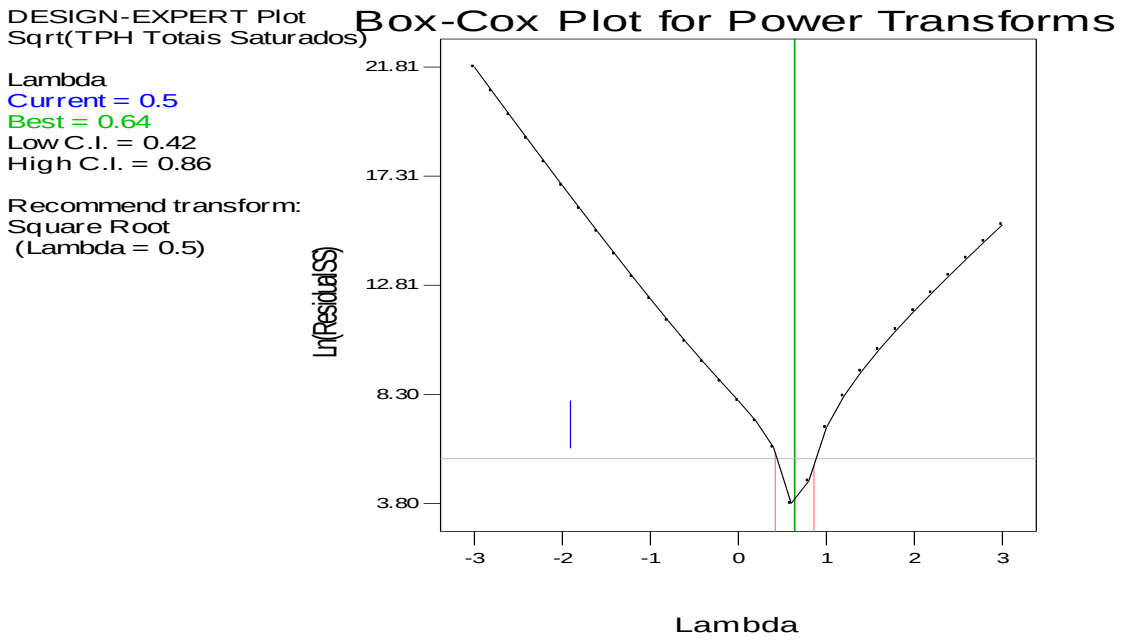



Figura 5.8: Modelo Box-Cox raiz quadrada (TPH totais saturados) pelo software Design Expert.

A Figura 5.9 comprova a adequação do modelo predito com o modelo experimental. Claramente, há um indicativo de que o modelo é capaz de fazer uma previsão satisfatória, sendo totalmente adequado, pois os pontos se apresentam bem alinhados à reta.

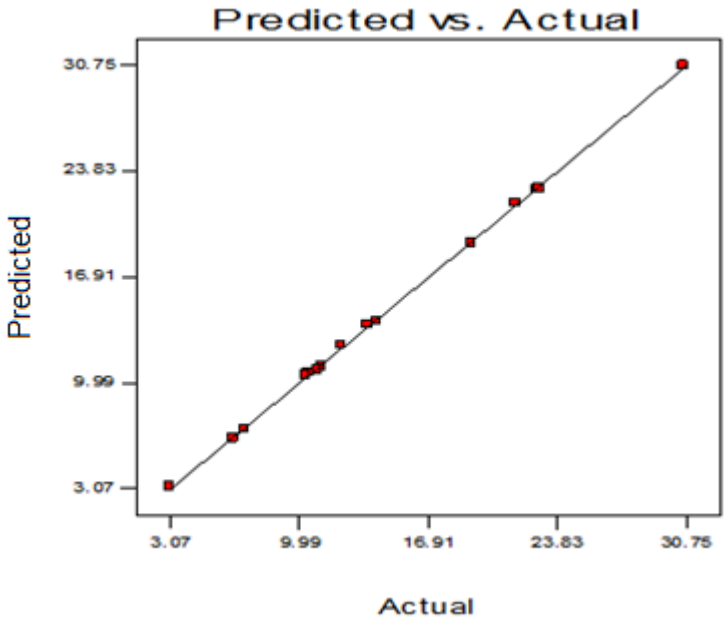



Figura 5.9: Modelo raiz quadrada (TPH totais saturados) pelo software Design Expert.

Após esta validação da adequação do modelo passou-se aos gráficos de correlação com o intuito de identificação da influência das variáveis sobre o processo (Figura 5.10).

O gráfico de perturbação apresentado na Figura 5.10 mostrou que a variação na quantidade de asfalteno utilizada (variável B) praticamente não gera alteração no resultado de TPH Saturados não influenciando no processo sob as condições estudadas. Enquanto que a agitação e a concentração de inóculo empregados apresentaram um papel relevante na degradação do asfalteno por *Yarrowia lipolytica*. Os melhores resultados à ação da levedura na conversão de asfalteno foram observados próximos aos menores valores de agitação e de inóculo (cerca de valor codificado = -0,6), e que aparentemente influenciam de forma semelhante nestas faixas. Trabalhos na literatura também reportam o efeito positivo causado pela concentração de inóculo e agitação (FERREIRA, 2009, MARTINS, 2011). O efeito positivo da concentração de inóculo já era esperado, pois quanto maior a população microbiana maior será a taxa de

biodegradação, ainda mais nas condições em que foram realizados os experimentos, adicionando apenas o asfalteno como fonte de carbono.

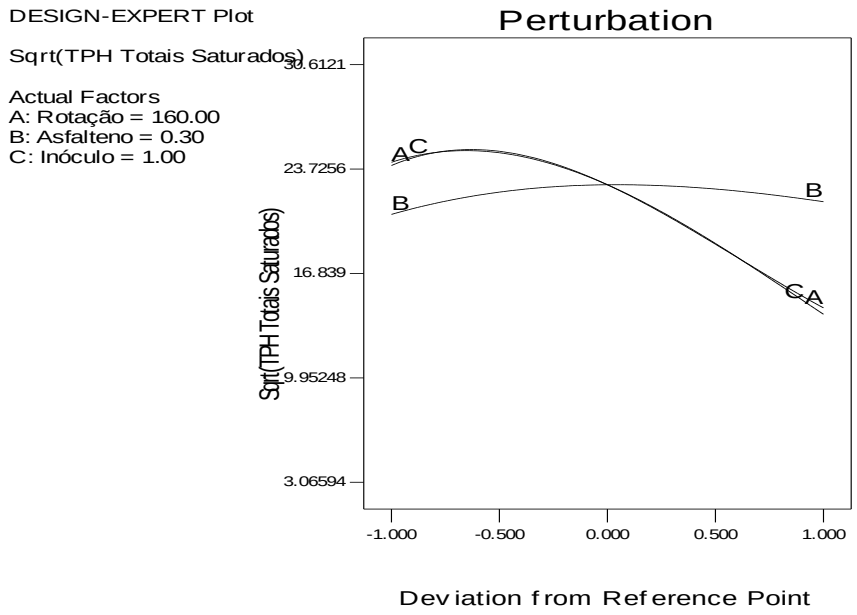
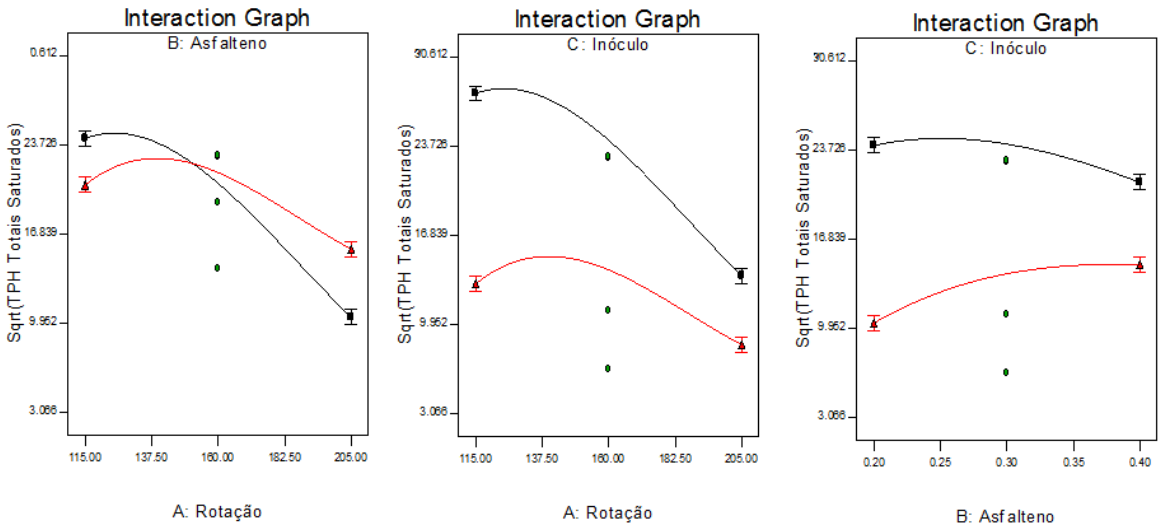



Figura 5.10: Análise de influência das variáveis no modelo cúbico.

Ferreira (2009) também analisou a concentração do inóculo sobre a ação de *Yarrowia lipolytica* usando como fonte de carbono petróleo e constatou que era uma variável de efeito significativo para o modelo.

A interação entre as variáveis também se mostra um fator preponderante para avaliação do processo, conforme observado na Figura 5.11. Próximo aos menores valores de concentração de asfalteno e agitação foram obtidos as melhores respostas de degradação com obtenção de saturados. O aumento nos valores destes parâmetros provoca diminuição considerável da resposta estudada.

As interações entre a concentração do inóculo e a agitação e a relação do asfalteno com o inóculo foram menos significativas, mas também apresentaram resultados superiores nas condições envolvendo os menores valores de faixa destes parâmetros.




. Figura 5.11: Análise de interação entre as variáveis independentes (*software Design Expert*), A (asfalteno/ agitação), B (inóculo/ agitação) e C (inóculo/ asfalteno)

De acordo com estes resultados pode-se concluir que os parâmetros mais influentes na degradação de asfaltenos pela levedura *Yarrowia lipolytica* foram a agitação empregada e a concentração do inóculo e que a quantidade de asfalteno não foi relevante na faixa estudada. Coerente com relatos de Martins (2011) em seus experimentos, que mostrou a agitação como uma variável que apresentou o maior efeito significativo sobre a produção de biomassa do sistema, sendo um parâmetro de grande relevância no crescimento celular, visto que, ao aumentar a população microbiana do meio, a tendência é aumentar a taxa de biodegradação.

## 5.4. Análise da Biodegradação por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC – *Gel Permeation Chromatography*)

A análise de GPC, realizada inicialmente, foi apenas qualitativa para podermos confirmar se realmente os objetivos de degradação parcial de asfaltenos pela *Yarrowia lipolytica* estavam sendo satisfatórios. Por esse motivo, foram avaliadas apenas algumas amostras previamente a análise por GC-FID.

Nas amostras de asfalteno foram visualizados picos indicando a evidência de compostos com moléculas de tamanhos diferentes. Frações de menor peso molecular podem ser observadas nas amostras que apresentaram um deslocamento de área no

cromatograma para o lado esquerdo, área X. Já outras amostras, que declinaram um prolongamento maior para o lado direito do cromatograma, apresentaram assim, maior teor de compostos de alto peso molecular, áreas Z e W. Foram observados resultados satisfatórios com redução de áreas de maior peso molecular (Z e W) e aumento das áreas de menor peso (X) (Figuras 5.12 a 5.13).

Na Figura 5.12, a curva preta se refere ao asfalteno A bruto antes da degradação. A outra curva se refere ao asfalteno biodegradado nas condições de 115rpm de agitação, quantidade de 200mg de asfalteno e concentração celular inicial de 1,45 mg p.s./mL de meio de cultivo por peso seco de células. Neste ensaio 5 foi observado o melhor resultado dentre as amostras do asfalteno A (modelo arquipélago) analisadas em GPC devido a redução das moléculas nas áreas Y, Z e W de pesos moleculares médios e pesados. Enquanto que houve um aumento da área X, com obtenção de produtos mais leves, claramente decorrentes da ação da levedura.

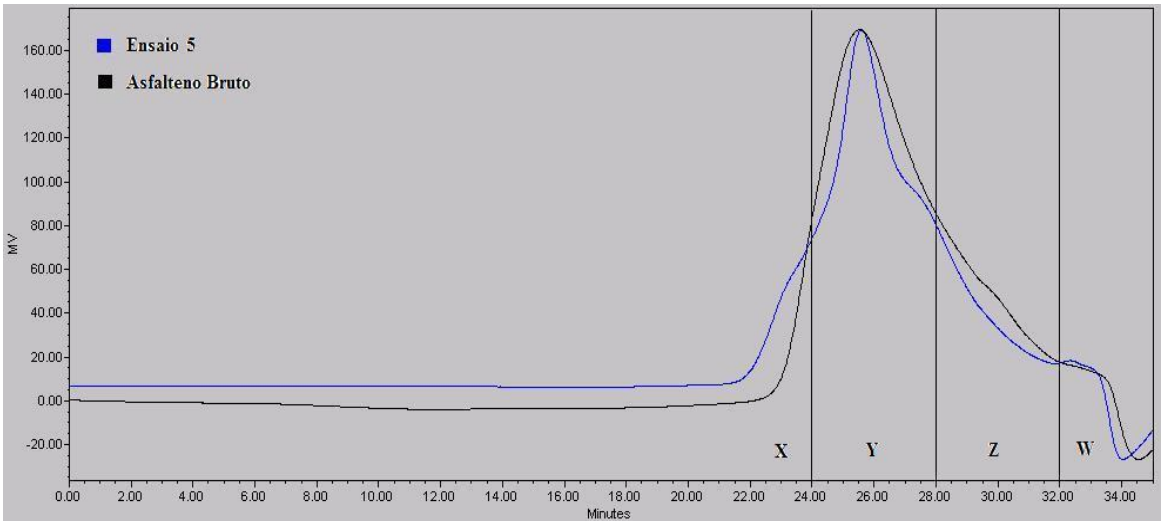



Figura 5.12: Análise de degradação por GPC para as amostras de asfalteno A bruto e ensaio 05 do asfalteno A (115rpm, 200mg de asfalteno, 1,45mg/mL de inóculo).

Na Figura 5.13 a curva preta se refere ao asfalteno B bruto sem ter sofrido processo de degradação. As demais curvas são diferentes experimentos após catálise da levedura. A curva azul teve o asfalteno biodegradado nas condições de 115rpm de agitação, quantidade de 200mg de asfalteno e inóculo de 1,45 mg p.s./mL de meio de cultivo por peso seco de células. Já a curva de cor verde indica o processo de degradação pela levedura nas condições de 160rpm de agitação, 300mg de asfalteno e

concentração celular inicial de 1,0 mg p.s./mL de meio de cultivo por peso seco de células. Observou-se em ambos os casos uma redução considerável das áreas Z e W de maior peso molecular.

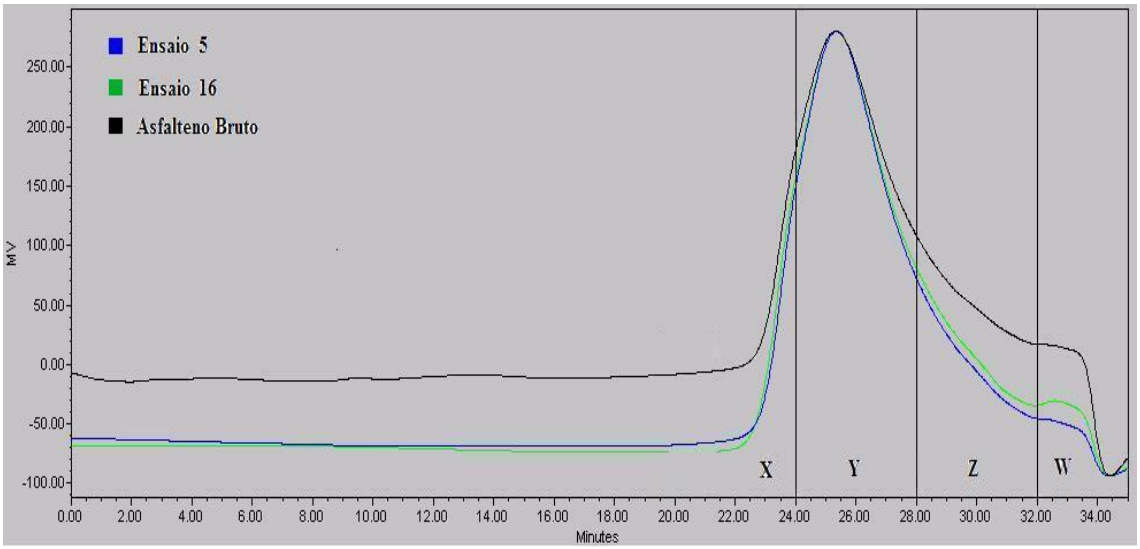



Figura 5.13: Análise de degradação por GPC para as amostras de asfalteno B bruto, ensaios 05 do asfalteno B (115rpm, 200mg de asfalteno, 1,45mg/mL de inóculo) e ensaio 16 do asfalteno B (160rpm, 300mg de asfalteno, 1,0mg/mL de inóculo).

## 5.5. Análise da Biodegradação por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chamas (GC-FID – *Gas Chromatography - Flame Ionization Detector*)

A fim de confirmar se *Y. lipolytica* é capaz de degradar os asfaltenos utilizados neste trabalho, as análises dos asfaltenos A e B brutos foram realizadas por GC-FID. Os cromatogramas encontram-se nas Figuras 5.14 a 5.16.

Foram realizadas as análises por GC-FID de todas as amostras do asfalteno A e, devido ao esgotamento do prazo e a falta de disponibilidade de equipamentos adequados, foi inviável a apresentação de todos os resultados do asfalteno B (ainda aguardando liberação).

Podemos verificar que os compostos avaliados no meio de cultivo apresentam tamanho dos picos de formas diferentes. A diferença na intensidade dos picos está relacionada com as condições da amostra. Tamanqueira (2006), relatou que o processo

de degradação tem início com a remoção dos hidrocarbonetos mais leves seguidos por outros progressivamente mais pesados na seguinte ordem: *n*-parafinas, isoprenóides, hopanos, esteranos, diasteranos, esteróides aromáticos e porfirinas.

Na Figura 5.14, comparando o cromatograma do asfalteno A bruto com o degradado foi observado que, como era de se esperar, no asfalteno bruto não são detectados picos referentes a moléculas de baixo peso molecular que surgem na amostra degradada. Houve um grande aumento na concentração de TPH total na área de compostos médios a pesados detectáveis por CG chegando a um valor de 110ppm.

Como a fração de saturados é a mais facilmente disponível para a ação da *Yarrowia lipolytica*, estas áreas não se apresentam com valor tão alto, pois tem uma tendência de ao serem produzidas, serem rapidamente consumidas pela própria levedura. Assim, foi observado no cromatograma do asfalteno degradado, picos de compostos de alto peso molecular que possivelmente foram obtidos pela degradação de estruturas moleculares presentes no asfalteno bruto muito mais complexas.

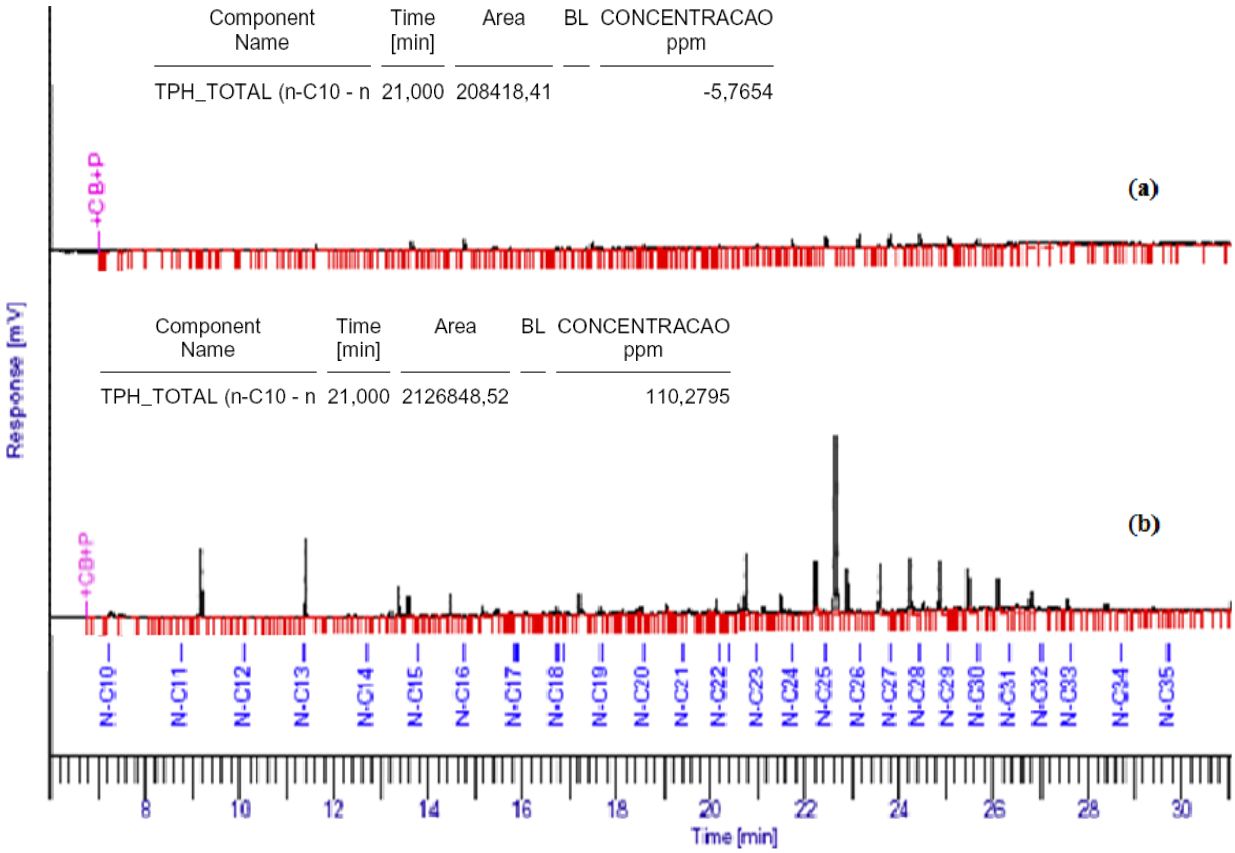



Figura 5.14: Cromatograma da fração saturada do asfalteno A bruto (a) e fração saturada do asfalteno A após processo de biodegradação por *Yarrowia lipolytica* (b) referente as condições do ensaio 5 (115rpm de agitação, 200mg de asfalteno, 1,45 mg/mL de inóculo).

A Figura 5.15 permite a comparação da concentração de TPH total aromática do asfalteno A bruto, que é de aproximadamente 3 ppm, para o resultado do asfalteno biodegradado que é 10 vezes maior, confirmando a degradação de espécies mais complexas gerando espécies detectáveis por CG. É possível observar também que após o processo de biodegradação do asfalteno por *Yarrowia lipolytica*, a concentração dos compostos de peso intermediário (C16 a C22) diminui, e a quantidade de compostos mais pesados (maior tempo de retenção, superior a C22) aumenta confirmando que houve de fato degradação do asfalteno com liberação de moléculas detectáveis.

Correlacionando o resultado da fração saturada com a da fração aromática do mesmo asfalteno nas mesmas condições, pode-se confirmar que realmente a fração aromática devido às suas interligações anel-anel, não favorecem a ação da levedura quando comparada a estrutura da fração saturada, mas que mesmo assim esta consegue degradar a parte aromática.

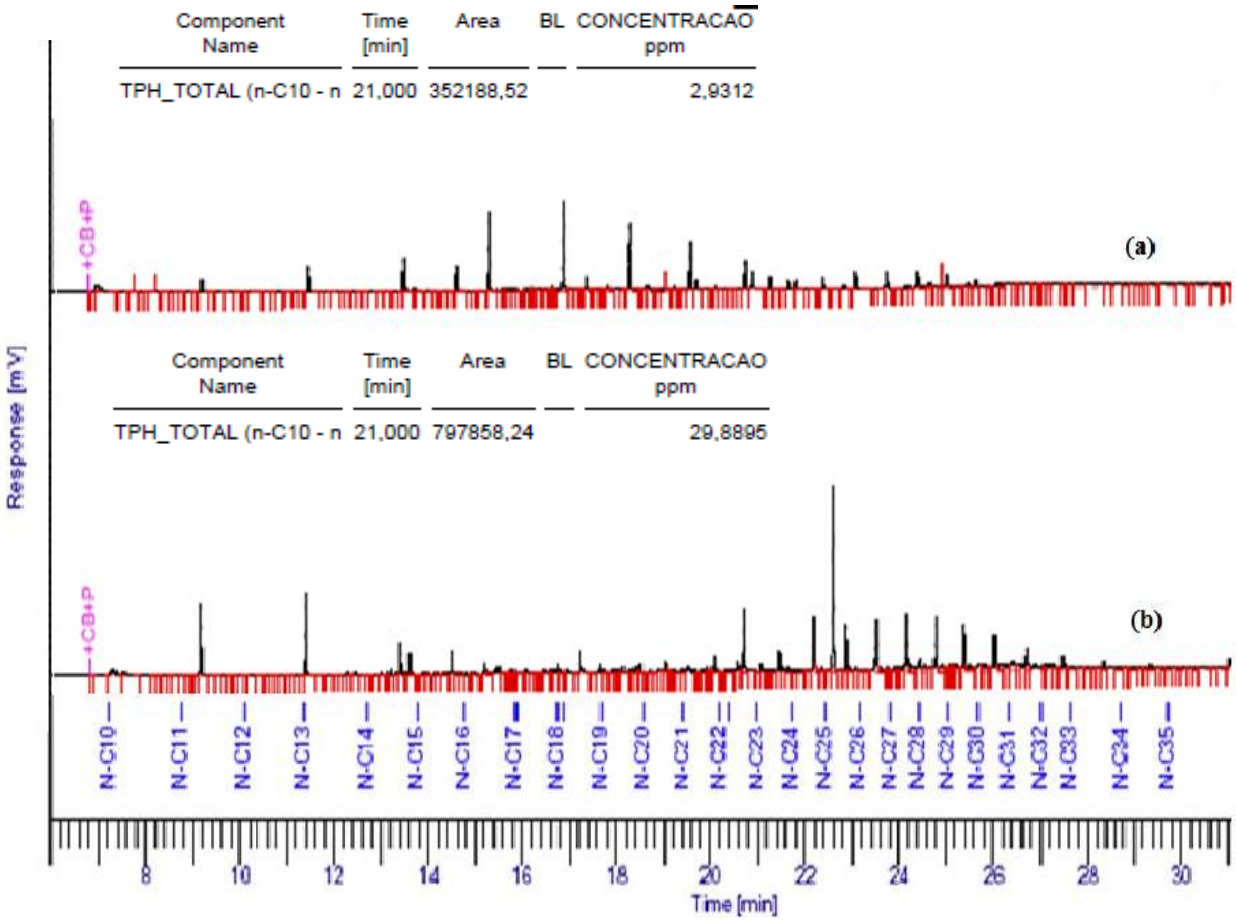



Figura 5.15: Cromatograma da fração aromática do asfalteno A bruto (a) e fração aromática do asfalteno A após processo de biodegradação por *Yarrowia lipolytica* (b) referente as condições ao ensaio 01 (115rpm de agitação, 200mg de asfalteno, 0,55 mg/mL de inóculo)

A Figura 5.16 compara cromatogramas das espécies provenientes do tratamento aromático nos dois diferentes asfaltenos A e B. As respostas para cada asfalteno são bem diferentes seja ele predominantemente arquipélago ou continental, frente a influência da ação biocatalisadora da levedura. Esses experimentos foram realizados nas mesmas condições de 160rpm de agitação, 300mg de asfalteno e 1,0mg/mL de inóculo. Como esperado, o asfalteno A, modelo predominantemente arquipélago, apresentou um resultado mais satisfatório (C=28ppm) comparado ao asfalteno B, modelo predominantemente continental (C=3ppm), devido apresentar pequenos núcleos aromáticos interligados por pontes alifáticas muito mais susceptíveis a ação de degradação por micro-organismos do que o modelo continental com núcleo altamente aromática e com alta estabilidade, comprovando que a estrutura molecular do composto interfere fortemente no resultado do processo e pode ser usada como parâmetro para viabilização de tratamentos específicos.

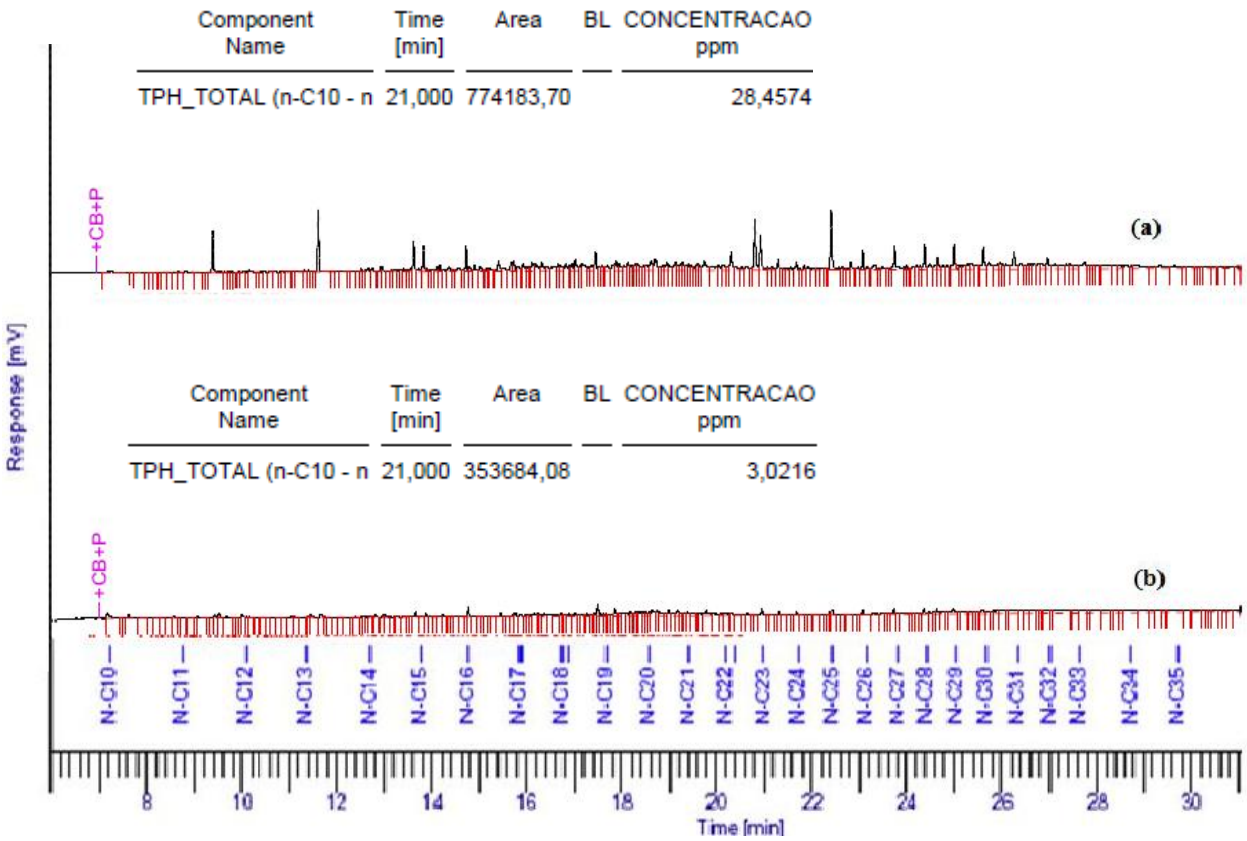



Figura 5.16: Cromatograma da fração aromática do asfalteno A (a) e da fração aromática do asfalteno B (b) após processo de biodegradação por *Yarrowia lipolytica*, referente as condições do ensaio 16 (160rpm de agitação, 300mg de asfalteno, 1,0mg/mL de inóculo).

Ferreira (2009) também corrobora com esses resultados confirmando que a levedura *Yarrowia lipolytica* é capaz de assimilar alguns hidrocarbonetos presentes no óleo cru, principalmente os hidrocarbonetos de menor peso molecular.

Na literatura existem poucas publicações com abordagem semelhante a este trabalho. Pineda-Flores *et al.*(2004) trabalharam em cima de um consórcio microbiano capaz de usar asfaltenos como fonte de carbono e seus resultados revelaram a possibilidade da utilização de micro-organismos para a redução de asfaltenos em ecossistemas, onde se acumulam e causam problemas.

Tavassoli *et al.*(2011) também isolaram diversas espécies de micro-organismos que poderiam degradar asfalteno e como resultado obtiveram capacidade máxima de biodegradação de 48% de asfalteno em uma cultura mista.

Como este trabalho foi o precursor com esta aplicação de degradação parcial com vistas à formação de produtos com aplicabilidade, muito ainda precisa ser feito. Os resultados apresentados confirmam que a premissa foi verdadeira e que é possível utilizar a levedura escolhida e obter produtos degradados de peso molecular dentro de uma expectativa de aplicabilidade muito maior que os originalmente existentes. Esforços devem ser conduzidos agora visando a identificação dos produtos gerados e a otimização do processo de degradação parcial.

# 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- ✓ *Yarrowia lipolytica* mantém a capacidade de crescimento celular mesmo tendo como fonte de carbono uma fração com características hidrofóbicas e altamente aromática como o asfalteno.
- ✓ Caracterização prévia do asfalteno é de extrema importância, considerando que a estrutura molecular influencia no processo de biodegradação, seja modelo continental ou arquipélago.
- ✓ O planejamento experimental aplicado foi uma ferramenta de grande importância para uma avaliação mais precisa do modelo empregado neste estudo.
- ✓ Dentre as variáveis estudadas, àquelas que realmente influenciaram no processo de biodegradação de asfaltenos por *Y. lipolytica* foram: agitação e concentração do inóculo. A quantidade de asfalteno empregada no processo não se mostrou significativa.
- ✓ *Y. lipolytica* na presença de solventes orgânicos como acetofenona, tetrahidrofurano e tolueno não apresenta crescimento celular aceitável, sendo desaconselhável a utilização dos mesmos. No entanto, dentre os solventes orgânicos estudados, o que menos causou toxicidade no crescimento da levedura foi o tetrahidrofurano.
- ✓ *Y. lipolytica* quando empregada para degradação de hidrocarbonetos em meio aquoso não demanda a adição de surfactantes sintéticos para melhor homogeneização da fase orgânica, pois a própria levedura tem capacidade de produção de biossurfactantes.
- ✓ Os resultados de biodegradação parcial obtidos pelo asfalteno com características estruturais predominantemente arquipélago (asfalteno A) sugeriram ter sido este mais biodegradado por *Y. lipolytica* do que o modelo continental (asfalteno B).
- ✓ Ao contrário do que se esperava, os menores níveis empregados como 200mg de asfalteno, 0,55mg/ml de inóculo e 115 rpm de agitação foram

os que obtiveram os melhores resultados dentre as condições estudadas do asfalteno A (modelo arquipélago).

- ✓ Ainda que sejam necessários estudos complementares nesta linha, os resultados do presente trabalho sugerem que a levedura *Yarrowia lipolytica* tem potencial para ser empregada em processo de biodegradação parcial de asfaltenos, com vista à geração de compostos orgânicos de maior valor agregado, a partir de um resíduo de processo das refinarias.

# 7. SUGESTÕES

- ✓ Métodos analíticos devem ser empregados para caracterização das amostras degradadas, com o intuito de especificar em quais produtos o asfalteno pode ter sido transformado depois da atuação do micro-organismo.
- ✓ Estudar e aplicar outros micro-organismos que possam auxiliar de forma positiva a viabilidade de obtenção de produtos de maior valor agregado a partir de asfalteno.
- ✓ Empregar outras variáveis, como adição de oxigênio, tempo de inoculação, relação C/H, temperatura, que possam otimizar o processo, na tentativa de uma maior taxa de degradação pelo micro-organismo.
- ✓ Desenvolvimento de outras técnicas mais específicas para conversão de asfaltenos em um produto economicamente rentável.

# 8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA


ABBASNEZHAD, H.; GRAY, M. and FOGHT, J. M. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. Appl Microbiol Biotechnol v.92, p.653–675, 2011.

ACEVEDO, S. *et al*. Investigation of Physical Chemistry Properties of Asphaltenes Using Solubility Parameters of Asphaltenes and Their Fractions A1 and A2. Energy Fuels v.24, p.5921–5933, 2010.

AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C. F. and COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. food and bioproducts processing v.87, p.179–186, 2009.

AMARAL, P. F. F. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Dissertação de Doutorado. Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

AMARAL, P. F. F. *et al*. Production and characterization of a bioemulsifier from Yarrowia lipolytica. Process Biochemistry v.41 p.1894–1898, 2006.

AMIN, J. S. *et al*. Prediction of Asphaltene Precipitation: Learning from Data at Different Conditions. Energy Fuels v.24, p.4046–4053, 2010.

ANDERSEN, S. I. and SPEIGHT, J. G. Thermodynamic Models for Asphaltene Solubility and Precipitation. Journal of Petroleum Science and Engineering, v.22, p.53-66, 1999.

ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental Perspective. Microbiological Reviews, v.45, nº1, p.180-209, 1981.

BANKAR, A. V.; KUMAR, A. R. and ZINJARDE, S. S.. Environmental and industrial applications of Yarrowia lipolytica. Appl Microbiol Biotechnol v.84, p.847–865, 2009.

BARKER, C. editado por E.CDonaldson, G.V. Chilingarian & T.F. Yen. Origin, Composition and Properties of Petroleum, Enhanced Oil Recovery, I Fundamentals and Analyses, Elsevier, Amsterdam, Capítulo 2,1985.

BARTH, G. e GAILLARD, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica. FEMS Microbiology Reviews v.19, p.219-237, 1997.

BEHAR, F. and PELET, R. Characterization of asphaltenes by pyrolysis and chromatography. Journal of Analytical and Applied Pyrobsis, v.I, p.121- 135, 1984.

CARAUTA, A. N. M. *et al.*, Conformational search and dimerization study of average structures of asphaltenes. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM v.755 p. 1–8, 2005.

DANIAL-FORTAIN, P.; GAUTHIER, T.; MERDRIGNAC, I.; BUDZINSKI. H.; Reactivity study of Athabasca vacuum residue in hydroconversion conditions. Catalysis Today v.150, p.255–263, 2010.

DURAND, E. *et al*. Effect of Chemical Composition on Asphaltenes Aggregation, Energy Fuels v.24, p.1051–1062, 2010.

FERREIRA, T.F. Emprego de *Yarrowia Lipolytica* na Degradação de Óleo Cru. Dissertação de Mestrado. Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

FICKERS, P. *et al*. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Research v.5, p.527–543, 2005.

FONTES, G. C. F.; AMARAL, P. F. F.; NELE, M. and COELHO, M. A. Z. Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by Yarrowia lipolytica. Journal of Biomedicine and Biotechnology v.10, p.1155-1162, 2010.

FUKUMAKI, T. *et al*. Isolation of a marine yeast that degrades hydrocarbon in the presence of organic solvent. Biosci. Biotech. Biochem., v.58 nº 10, p.1784-1788, 1994.

GAUTHIER, T. *et al*. Studies on the evolution of asphaltene structure during hydroconversion of petroleum residues. Catalysis Today v.130, p.429–438, 2008.

GRAY. M. R. Consistency of Asphaltene Chemical Structures with Pyrolysis and Coking Behavior. Energy & Fuels v.17, p.1566-1569, 2003.

HAEGLER, A.N. and MENDONÇA-HAEGLER, L.C. Yeast from marine and astuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil, Appl. Environ. Microbiol., v.41, nº 1, p.173-178, 1981.

HIRSCHBERG, A.; DE JONG L. N. J.; SCHIPPER B. A. and MEIJER J. G. Influence of Temperature and Pressure on Asphaltene Flocculation. SPE Journal, v.24, nº 3, p.283-293, 1984.

HONG E, P. W. A study of asphaltene solubility and precipitation. Fuel v.83, p.1881–1887, 2004.

HORVATH, R. S. Microbial Co-Metabolism and the Degradation of Organic Compounds in Nature. Bacteriological Reviews, v. 36, nº 2, p.146-155, 1972.

ISKEN, S. and DE BONT, J. A. M. Bacteria tolerant to organic solvents. Extremophiles, v.2, p.229-238, 2008.

KAR, T. *et al.* Physical and physiological impacts of different foam control strategies during a process involving hydrophobic substrate for the lipase production by *Yarrowia lipolytica*. Bioprocess Biosyst Eng, DOI 10.1007/s00449-011-0614-z, 2011.

KRONBERG, F.; GIACOMETTI, R.; RUIZ-HERRERA, J. and PASSERON, S. Characterization of the regulatory subunit of Yarrowia lipolytica cAMP-dependent

protein kinase. Evidences of a monomeric protein, Archives of Biochemistry and Biophysics, v.509, p.66–75, 2011.

LEAHY, J.G. and COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in The Environment. Microbiological Reviews, v.54, nº3, p.305-315, 1990.

LEÓN, O.; ROGEL, E.; CONTRERAS, E. Amphiphile Adsorption on Asphaltenes Particles: Adsorption Isotherms and Asphaltene Stabilization. Colloids Surf. A, v.189, nº 1-3, p.123-130, 2001.

LIMA, V.de S. Avaliação Da Influência Da Temperatura De Corte Sobre As Frações Asfaltênicas. Dissertação de Mestrado. Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

LU, Z. *et al.* Effect of tetrahydrofuran on enzyme activities in activated sludge. Ecotoxicology and Environmental Safety v.70, p.259–265, 2008.

MARTINS, F. F. Estudo das condições de biodegradação de óleo cru por *Yarrowia* lipolytica. Dissertação de Projeto Final. Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

MERDRIGNAC, I.; QUOINEAUD, A. and GAUTHIER, T. Evolution of Asphaltene Structure during Hydroconversion Conditions. Energy & Fuels v.20, p.2028-2036, 2006.

MOHAMMADI, M. *et al.* Inhibition of Asphaltene Precipitation by $TiO_2$, $SiO_2$, and $ZrO_2$ Nanofluids. Energy Fuels v.25, p.3150–3156, 2011.

MONTEIRO, A.S. *et al*. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. Bioresource Technology v.101, p.5186–5193, 2010.

MOSCHOPEDIS, S. E.; FRYER, J. F. and SPEIGHT. J. G. Investigation of asphaltene molecular weights. Fuel, v.55, p.227-232, 1976.

MULLINS, O. C. *et al.* Molecular Size of Asphaltene Fractions Obtained from Residuum Hydrotreatment. *Fuel*, v.82, nº 9, p.1075-1084, 2003.

MURGICH, J. Molecular Mechanics and Microcalorimetric Investigations of the Effects of Molecular Water on the Aggregation of Asphaltenes in Solutions. Langmuir v.18, p.9080-9086, 2002.

MURGICH, J.; RODRIGUEZ, J., and ARAY, Y. Molecular Recognition and Molecular Mechanics of Micelles of Some Model Asphaltenes and Resins Energy & Fuels v.10, p.68-76, 1996.

National Academy of Sciences (NAS). Oil in the Sea: Inputs, Fatesand Effects. National Academy Press, Washington, DC, 1985.

NAHAR, N.; ALAUDDIN, M. and QUILTY, B. Toxic effects of toluene on the growth of activated sludge bacteria. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.16, p.307-311, 2000.

OUDOT, J and CHAILLAN, F. Pyrolysis of asphaltenes and biomarkers for the fingerprinting of the Amoco-Cadiz oil spill after 23 years. C. R. Chimie v.13, p.548–552, 2010.

OUDOT, J. Biodégradabilité du fuel de l'Erika. Life Sciences v.323, p.945–950, 2000.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; KOMAITIS, M.; MARC, I. AND AGGELIS, G. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures, *Applied* Microbiology and Biotechnology, v.58, p.308-312, 2002.

PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: Formation of a biosurfactant; Effects on respiratory activity and growth. Applied Microbiology and Biotechnology, v.8, p.1-2, 1979.

PERAZA, A.; SÁNCHEZ, M. and RUETTE, F. Modeling Free-Radical Reactions, Produced by Hydrocarbon Cracking, with Asphaltenes, Energy & Fuels v.24, p.3990–3997, 2010.

PESARINI, P. F. Fotoquímica de Asfalteno. Dissertação de Doutorado, Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PINEDA-FLORES, G. *et al*. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. Biodegradation v.15, p.145–151, 2004.

PRINCE, R.C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. Critical Reviews in Microbiology, v. 19, nº4, p.217-242, 1993.

REYNOLDS, J. G. and BIGGS, W. R. Application of Size Exclusion Chromatography Coupled with Element-Specific Detection to the Study of Heavy Crude Oil and Residua Processing. Acc. Chem. Res. v.21, nº 9, p.319-326, 1988.

RONTANI, J. F. *et al.* Analytical study of Asthart crude oil asphaltenes biodegradation. Chemosphere, v.14, nº 9, p.1413-1422, 1985.

RUBINSTEIN, I.; SPYCKERELLE, C. and STRAUSZ, O. P. Pyrolysis of asphaltenes: a source of geochemical information. Geochimica et Cosmochimica Acta., v.43, p.1-6, 1979.

SATPUTE, S. K. *et al*. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. Biotechnology Advances v.28, p.436–450, 2010.

SHEREMATA, J. M. *et al.* Quantitative Molecular Representation and Sequential Optimization of Athabasca Asphaltenes. Energy & Fuels v.18 p.1377-1384, 2004.

SHEU, E. Y. and MULLINS, O. C. Asphaltenes, fundamentals and applications. Plenum Press. New York and London, ISBN No. 0-306-45191-3, 1995.

SPEIGHT, J. G. The chemistry and physics of coking. Korean J. Chem. Eng., v.15, nº1, p.1-8, 1998.

SPEIGHT, J. G. Handbook of petroleum analysis. John Wiley and Sons: New York, p. 343-368, 2001.

SPEIGHT, J. G. The Chemistry and Technology of Petroleum. 4ª Edição, Taylor and Francis, Boca Raton, 2006.

STOJANOVIC, K. *et al*. Pyrolysis and Pt(IV)- and Ru(III)-ion catalyzed pyrolysis of asphaltenes in organic geochemical investigation of a biodegraded crude oil (Gaj, Serbia). Fuel v.88 p.287–296, 2009.

STRAUSZ, O. P. Equipartitioning of Precipitant Solubles between the Solution Phase and Precipitated Asphaltene in the Precipitation of Asphaltene. Energy & Fuels, v.20, p.2013-2021, 2006.

TAHHAN, R. A. *et al.* Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. International Biodeterioration & Biodegradation v.65, p.130-134, 2011.

TAMANQUEIRA, J.B. Caracterização de diamantóides em amostras de óleos da bacia sedimentar brasileira. Dissertação (Mestrado em Ciências), COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

TAVASSOLI, T. *et al.* Asphaltene biodegradation using microorganisms isolated from oil samples. Fuel, 2011, doi:10.1016/j.fuel.2011.10.021.

TEIXEIRA, W. *et al*. Decifrando a Terra, São Paulo, USP - Oficina de Textos, 2003.

THOMAS, J. E. (organizador). Fundamentos da Engenharia de Petróleo. Rio de Janeiro, Interciência, 2001.

TISSOT, B. P. and WELTE, D. H. Petroleum Formation and Occurrence – A New Approach to Oil and Gas Exploration 2nd edition, Springer-Verlag, p.699, 1984.

VALLE, M. L. M. Produtos do setor de combustíveis e de lubrificantes. Rio de Janeiro, Publit, 2007.

VENOSA, A. D. and ZHU, X. Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. Spill Science & Technology Bulletin, v. 8, nº2, p.163–178, 2003.

WU, J. and PRAUSNITZ, J.M. Molecular Thermodynamics of Asphaltene Precipitation in Reservoir Fluids. AIChE Journal v.46, nº 1, p.197-209, 2000.

YAO, Y. *et al.* The effect of tetrahydrofuran on the enzymatic activity and microbial community in activated sludge from a sequencing batch reactor. Ecotoxicology v.21, p.56–65, 2012.

ZINJARDE, S. S. and PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. Journal of Basic Microbiology, v.42, p.67–73, 2002.