



Universidade Federal
do Rio de Janeiro

Escola Politécnica

UTILIZAÇÃO DE MATERIAL ENCAPSULADO
CONTENDO NITROGÊNIO E FÓSFORO NA
BIORREMEDIAÇÃO DE SISTEMA CONTAMINADO COM
HIDROCARBONETOS

Emelay Pereira Bispo

2015

UTILIZAÇÃO DE MATERIAL ENCAPSULADO CONTENDO NITROGÊNIO E
FÓSFORO NA BIORREMEDIAÇÃO DE SISTEMA CONTAMINADO COM
HIDROCARBONETOS

Emelay Pereira Bispo

Projeto de Graduação apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental da Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Engenheiro.

Orientadora: Dr^a. Selma Gomes Ferreira Leite

Rio de Janeiro

Março

2015

UTILIZAÇÃO DE MATERIAL ENCAPSULADO CONTENDO NITROGÊNIO E
FÓSFORO NA BIORREMEDIAÇÃO DE SISTEMA CONTAMINADO COM
HIDROCARBONETOS


Emelay Pereira Bispo

PROJETO DE GRADUAÇÃO SUBMETIDO AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE
ENGENHARIA AMBIENTAL DA ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE ENGENHEIRO AMBIENTAL.

Examinada por:



Prof. Dr^a Maria Claudia Barbosa



Prof. Dr^a Lidia Yokoyama



Prof. Dr^a. Selma Gomes Ferreira Leite

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO/ 2015

Bispo, Emelay Pereira

Avaliação da Utilização de Sistema de Liberação Lenta de Nitrogênio e Fósforo na Biorremediação de Sistemas Contaminados com Hidrocarbonetos/ Emelay Pereira Bispo. – Rio de Janeiro: UFRJ/ Escola Politécnica/ Curso de Engenharia Ambiental, 2015.

Orientadora: Selma Gomes Ferreira Leite

Projeto de Graduação – UFRJ/ Escola Politécnica/ Curso de Engenharia Ambiental, 2015.

Referências Bibliográficas: p.

1.Biorremediação 2.Bioestímulo 3.Microencapsulamento 4. Óleo e combustível I. Pereira Bispo, Emelay. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola Politécnica, Curso de Engenharia Ambiental. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe Maria, meu pai Ademir, minha irmã
Kenia, meu namorado Renato e Nirvana, minha família.



Agradecimento à ANP/FINEP/MCT

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, e da Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP e do Ministério da Ciência e Tecnologia – MCT, por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo, Gás e Biocombustíveis.

Gostaria de agradecer ao Programa de Recursos Humanos da ANP, PRH-41, que me propiciou uma formação complementar em Engenharia Ambiental na Indústria do Petróleo, Gás, e Biocombustíveis na área de Ecologia Industrial, e em especial a professora Cláudia Morgado pela oportunidade, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por se fazer sempre presente em minha vida e ter trago sempre a solução nos momentos de maior dificuldade.

À minha família, minha mãe Maria, meu pai Ademir e minha irmã Kenia em especial, que me ajudou muito para concretização deste trabalho. Obrigada pelo apoio e me desculpem pela ausência.

Ao meu namorado Renato por estar sempre ao meu lado e me ajudar em tudo. Não tenho como agradecer por todos estes momentos.

À professora Cláudia Morgado e professor Newton Richa pelo apoio e incentivo. Aos colegas do PRH 41 e Gestore que sempre trouxeram inspiração e companheirismo.

À minha orientadora, professora Selma Gomes Ferreira Leite pela orientação.

Ao Everton por ter me conduzindo durante todo este trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia Industrial pelo apoio.

À professora Magali Christie Cammarota e a técnica Suzana do Laboratório de Tecnologia Ambiental por realizarem análises essenciais para este trabalho.

Às minhas amigas Thati (Thatiana Vitorino) e Thaynara (de Paula) por estarem sempre tão presentes em minha vida (mesmo que tão distantes fisicamente no momento), tanto na vida acadêmica quanto fora dela. Não tenho palavras para agradecer vocês. Muito obrigada!

Às minhas amigas Rapha, Vivian, Aninha e Fernandinha pela amizade durante a faculdade e por terem tornado minha vida acadêmica mais fácil e divertida.

Aos amigos da graduação Eduardo Jufra (Pimpão), Celina, Eduardo (43), Thaysa Viana, Henrique Crespo, Mariana Rodrigues, Lucas Lima, Gabriela Laport, Olívia Mercadante, Camila Távora, Morganna Werneck, Fábio e Seiti (Potter). Obrigada por dividir conhecimento e me acompanhar durante essa trajetória. Obrigada pela parceria e companheirismo.

A todos os meus professores da graduação que me capacitaram e inspiraram.

Aos colegas da GEAG/INEA, em especial ao Leonardo Daemon pela oportunidade. Obrigada pelo conhecimento fornecido e principalmente pela inspiração.

Aos amigos Patrícia, Maria Clara, Vera e Felipe. Obrigada pelo apoio, incentivo, por acreditarem e terem me ajudado a conquistar esta etapa.

Às amigas Bel (Izabel), Nélida, Fabiane, Aline (prima) e Larissa (prima) por me apoiarem durante essa jornada e por entenderem a minha ausência.

A todos os amigos e colegas dessa longa jornada que contribuíram de alguma forma para concretização dessa etapa. Muito obrigada!

"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, *que* um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."

Ayrton Senna

Resumo do Projeto de Graduação apresentado à Escola Politécnica/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheiro Ambiental.

Utilização de material encapsulado contendo nitrogênio e fósforo na biorremediação de sistema contaminado com hidrocarbonetos

Emelay Pereira Bispo

Março/2015

Orientadora: Dr^a. Selma Gomes Ferreira Leite

Um dos métodos mais eficientes para reduzir os efeitos adversos dos hidrocarbonetos no meio ambiente consiste no uso de microrganismos, agentes degradadores das mais diversas substâncias. No entanto, a população microbiana nativa requer outros nutrientes que podem encontrar-se em baixas concentrações para utilização destes compostos como fonte de carbono. Então, para o aproveitamento da atividade biológica para descontaminação do ambiente, nutrientes devem ser adicionados aos sistemas impactados de modo controlado. Essa adição pode ser feita utilizando o método de microencapsulação, no qual o material ativo é revestido geralmente por uma matriz (agente encapsulante), que controla a liberação para o meio. Neste trabalho utilizou-se nutrientes em cinco proporções diferentes de N:P (Exp1:10:1; Exp 2:15:1, Exp 3: 10:10, Exp4: 15:10 e Exp 5: (12, 5:5,5), encapsulados com alginato-capsul® e com um produto comercial utilizado na área agrícola, o osmocote®, com relação N:P de 10:10. Um experimento controle foi realizado sem adição de nutrientes. Foram feitos microcosmos com água da Baía de Guanabara, contaminados por óleo combustível. As concentrações de nutrientes remanescentes, concentração proteica (que indica crescimento microbiano) e a porcentagem de degradação do óleo foram analisadas. O experimento realizado sem os nutrientes, simulando a atenuação natural, teve taxa de degradação de 12,31%. Já o experimento conduzido com osmocote®, contendo também N e P (10: 10) imobilizados, teve uma boa resposta na degradação (55,06 %), mas inferior ao produto desenvolvido. As microcápsulas produzidas na relação N:P 10:10 foram capazes de estimular os microrganismos a degradar 55% do óleo combustível em 30 dias, resultado comparável ao produto comercial. Verificou-se, no entanto, que o experimento, em que o produto utilizado com relação N:P de 15:10 obteve melhor resultado de degradação que os demais (62,03%), mostrando seu potencial para possível aplicação em sistemas contaminados com hidrocarbonetos.

Abstract of Undergraduated Project presented to POLI/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Engineer.

Use of controlled release capsules of nitrogen and phosphorus for bioremediation of contaminated environments with hydrocarbons

Emelay Pereira Bispo

March/2015

Advisor: Dr^a Selma Gomes Ferreira Leite

Course: Environmental Engineering

One of most effective method used to reduce adverse effects of oil on the environment is the use of microorganisms which break down several substances. However, the native microbial population require an appropriate amount of nutrients, these compounds could be found in low levels to induce oil degradation. Thus, for environmental decontamination using biological activity, nutrients need to be added in a controlled manner. The encapsulation method, in which compounds are coated with a matrix (encapsulating agent), it is an alternative that control nutrients release. In the present work, we studied five different ratios of N:P (Exp1:10:1; Exp 2:15:1, Exp 3: 10:10, Exp4: 15:10 e Exp 5: 12,5:5,5.), encapsulated with alginate-capsul and a commercial product used for agriculture, called osmocote®, containing N:P ratio of 10:10 . A control experiment was performed without nutrients addition. Microcosms were prepared using Guanabara's Bay water which is contaminated with oil. The remaining nutrients concentration, protein levels and oil degradation percentage were investigated. Results show 62,03% of degradation increased in the experiment contenting N:P ratio of 15:10 compared to others. This finding suggest an ideal degradation level since the experiment without nutrients (natural attenuation) showed only 12,31% of degradation. Nevertheless, the osmocote® experiment, containing immobilized N and P (10:10), demonstrated a good degradation level (55,06%) but lower than the alginate-capsul encapsulate. The microcapsules made with N:P ratio of 15:10 could stimulate microorganisms to break down 55% of fuel oil, that it is comparable to commercial product. Our microcapsules containing the N:P ratio of 15:10 was capable to cause 62,03% of fuel oil degradation by microorganisms in 30 days, it shows its potential utilization in oil contaminated systems.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	
3.2 Objetivos Específicos	
4. METODOLOGIA DA PESQUISA	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	48
7. PERSPECTIVAS	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gotejamento da solução experimental no cloreto de cálcio	33
Figura 2: Cápsulas formadas após o gotejamento	34
Figura 3: Frascos do experimento dispostos no laboratório	35
Figura 4: Procedimento de extração de óleo da solução experimental	39
Figura 5: Teor de proteínas (mg/L)	42
Figura 6: Teor de nitrogênio (mg/L)	43
Figura 7: Teor de fósforo (mg/L).....	45
Figura 8: Degradação do óleo combustível em porcentagem após 30 dias ..	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proporções de Nitrogênio e Fósforo dos experimentos testados	28
Tabela 2: Composição do osmocote.....	30
Tabela 3: Composição Bushnell Has.....	31
Tabela 4: Massa dos compostos utilizados nas cápsulas.....	32
Tabela 5: Massa do encapsulado utilizado em cada experimento	35
Tabela 6: Análise das concentrações de nutrientes e proteínas ao longo de 30 dias...	41

LISTA DE SÍMBOLOS

BH – Bushnell- Hass

CETEM - Centro de Tecnologia Mineral

CONAMA CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE

FDA Food and Drug Administration

L - Litro

mm - Milímetro

mg - Miligrama

NPK - Nitrogênio, Fósforo e Potássio

pH – Potencial hidrogeniônico

rpm – Rotações Por Minutos

TPH - Hidrocarbonetos Totais do Petróleo

1. INTRODUÇÃO

No atual contexto mundial, em que a preocupação com o meio ambiente vem crescendo, o domínio de tecnologias que visam à minimização dos impactos causados por poluentes derivados das unidades de petróleo tem sido bastante incentivado.

A elevada potencialidade do uso de microrganismos, apontada na literatura como agentes degradadores das mais diversas substâncias, indica que o tratamento biológico é um dos métodos mais eficientes de reduzir os efeitos adversos dos hidrocarbonetos sobre o meio ambiente. No entanto, para que esses compostos sejam utilizados como fonte de carbono a população microbiana requer outros nutrientes que podem ser encontradas em baixas concentrações ou estar indisponíveis para que as atividades biológicas sejam conduzidas (BRAGA *et al.*, 2002).

Entretanto, estas substâncias devem ser adicionadas aos sistemas impactados de modo controlado. Essa adição pode ser feita utilizando a bioestimulação, técnica que visa estimular a microbiota nativa de um determinado ambiente em virtude do fornecimento adequado de nutrientes e de condições de cultivo (ROBB & MOYER, 2001). Uma das formas de controlar essa bioestimulação é a utilização do método de microencapsulação, no qual o material ativo, o agente encapsulante, é revestido por uma matriz, que controla a sua liberação para o meio (BERTOLINI *et al.*, 2001; FUJIMOTO 2002).

Com base nessas informações, este trabalho foi desenvolvido com produtos de liberação lenta de N e P para que fosse permitido o bioestímulo da microbiota local com potencial na biorremediação de sistemas impactados por derivados de petróleo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Petróleo e seu potencial de contaminação ambiental

O petróleo é uma das principais fontes de energia utilizadas no mundo e é responsável pelo estilo de vida moderno. A gasolina, o óleo diesel, querosene e lubrificantes, são utilizados em carros, ônibus, caminhões, tratores, trens e aviões, plásticos e embalagens, equipamentos eletrônicos, gás de cozinha, produtos químicos, alimentícios, roupas, fertilizantes, explosivos, ceras e parafinas, asfaltos, e inúmeros outros produtos. Estes são considerados os motores do desenvolvimento e do avanço tecnológico (EPA , 2008) .

A obtenção desses produtos exige uma cadeia de tecnologias complexas que compõem as plantas petroquímicas e refinarias. Nestes locais, o petróleo é convertido em gás natural veicular (GNV) e combustível diesel (JANBANDHU e FULEKAR, 2011).

No entanto, ainda que plantas petroquímicas e refinarias de petróleo proporcionem benefícios à sociedade, também produzem grande quantidade de resíduos oleosos sólidos (cerca de 10.000 m³ por dia) classificados como perigosos. Resíduos estes, que devido à natureza inflamável, corrosiva, tóxica ou patogênica não podem ser reutilizados ou reciclados (GAFAROV *et al.*, 2006).

A gasolina, por exemplo, consiste em hidrocarbonetos relativamente hidrofóbicos voláteis tais como alcanos, cicloalcanos, BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), fenol e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Muitos destes compostos são descritos como altamente poluentes, uma vez que apresentam um potencial mutagênico cancerígeno para os seres humanos além de serem tóxicos (JANBANDHU e FULEKAR, 2011, UBANI *et al.*, 2013,).

Dados históricos referem a ocorrência de acidentes diversas vezes durante o processo de obtenção, exploração, transporte, produção, refino e estocagem de petróleo e seus derivados. Durante esses processos sempre há a possibilidade de

vazamentos e derramamentos (VAN HAMME, SINGH e WARD, 2003, KASSAI *et al.*, 2005).

Entre os acidentes, destaca-se Exxon Valdez em março de 1989, quando o navio colidiu com um recife no Alasca, acarretando o despejo de aproximadamente 37000 toneladas de óleo. O óleo se espalhou pelo canal e chegou à costa também, em uma extensão estimada de 1800 km. O acidente foi um dos maiores derramamentos de óleo registrados em águas americanas e atingiu uma área com importante atividade de pesca e vida selvagem. (ITOPF, 2014).

Em abril de 2010 outro acidente, no Golfo do México, também teve destaque: um vazamento, de 5 milhões de barris (cerca de 795.000.000L) que durou 106 dias . Uma explosão e um incêndio na plataforma Deepwater Horizon, da BP, que extraía mais de um milhão de litros de petróleo por dia deram início ao vazamento. Aproximadamente 800.000 litros de petróleo por dia vazaram do poço. Este foi considerado o pior vazamento de petróleo da história dos Estados Unidos (CRUZ, 2012).

Em janeiro de 2000, ocorreu o vazamento de cerca de 1,3 milhão de litros de óleo combustível proveniente de uma falha no oleoduto de 13 quilômetros de comprimento do que leva óleo da REDUC (Petrobras) para o tanque de armazenamento localizado na Ilha d'Água, durante quatro horas na Baía da Guanabara, provocando um dos maiores desastres ambientais do Brasil. (CAMERINI, 2000)

Na Bacia de Campos no RJ em novembro de 2011 a Chevron, uma das principais empresas de energia no mundo, informou que a fonte da mancha foi o óleo proveniente de uma falha na superfície do fundo do mar, localizada próxima ao Campo Frade.

Nesse sentido, crescem os relatos relacionados ao potencial de contaminação do solo e da água por petróleo e seus derivados, considerado um dos principais contaminantes do meio ambiente. Dentre as principais fontes de contaminação destacam-se: acidentes no transporte de combustível por navios e caminhões; vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneo, que estão sujeitos à corrosão como em estações de gás; a própria extração de petróleo e operações de

processamento; lançamento inadequado de resíduos oleosos gerados por indústrias na produção de plásticos, solventes, produtos farmacêuticos e cosméticos, etc (LIN *et al.*, 2010).

Diversos derramamentos de óleo ocorreram em locais estratégicos como regiões costeiras, águas continentais, regiões de mangue, dos estuários e das águas oceânicas que causaram impactos ambientais que duram décadas (OLIVEIRA, 2011). Os hidrocarbonetos BTEX tornaram-se uma grande preocupação na poluição da água devido à sua elevada toxicidade e fácil dispersão em ambientes aquáticos (MAZZEO *et al.*, 2011). De fato, o ambiente marinho tem sofrido com constantes derrames de petróleo, um dos contaminantes orgânicos mais abundantes no mar. A mídia tem denunciado constantemente o vazamento de milhares de toneladas de petróleo que contaminam a água do mar (OESP, 2000 e 2013).

FELLENBERG (1980) relataram que, quando em contato com água, óleos e seus derivados espalham-se formando uma fina camada sobre a superfície que impede as trocas gasosas entre o ar e a água. Um litro de óleo pode esgotar o oxigênio em um milhão de litros de água e formar uma camada de 1000m² na superfície do solo em apenas alguns dias (YEUNG *et al.*, 2011). No solo, as plantas têm a fotossíntese interrompida devido a uma vedação na entrada dos estômatos das raízes que inibe a absorção de nutrientes (FELLENBERG, 1980). Já no mar, essa camada bloqueia também a luz solar que chega às plantas, que em conjunto com a prejudicada disponibilidade de oxigênio, impedem a respiração (YEUNG *et al.*, 2011).

Os ambientes marinhos ou sob influência direta do mesmo são extremamente importantes por abrigarem elevada diversidade de animais, plantas e microrganismos, além de atividades humanas economicamente relevantes como o turismo, recreação e pesca (OLIVEIRA, 2011).

O petróleo possui características persistentes no meio ambiente, por isso a necessidade de retirar esses constituintes quando acidentalmente despejados na natureza para o bom funcionamento dos ecossistemas (KASSAI *et al.*, 2005).

De modo geral, métodos físicos como barreiras de contenção, remoção mecânica e lavagem usando alta pressão ou água quente; e métodos químicos, como aplicação de dispersantes, desmulsificantes, solidificantes e agentes formadores de filme são os métodos mais comumente empregados para a retirada de petróleo e seus derivados do ambiente (OLIVEIRA, 2011). Contudo, esses procedimentos raramente proporcionam a total remoção dos contaminantes, permanecendo ainda a possibilidade de que os produtos adicionados continuem no ambiente, que no caso dos químicos podem ser também tóxicos (ZHU e VENOSA, 2005).

Biorremediação – possibilidade de descontaminação ambiental

A presença desses contaminantes no ambiente evidencia a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para evitar a destruição de ecossistemas, especialmente os marinhos.

A biorremediação constitui uma das possibilidades para descontaminar ecossistemas. Baseia-se na decomposição biológica de hidrocarbonetos pela ação de microrganismos que utilizam estes poluentes como fonte de carbono para obtenção de energia, biodegradando-os em dióxido de carbono, água, sais minerais e gases (BANAT *et al.*, 2010). É considerada uma forma eficiente, econômica, versátil e ambientalmente segura (SINGH e LIN, 2008).

No entanto, essa biodegradação é frequentemente limitada pela disponibilidade de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (OLIVEIRA, 2011). A literatura aponta para a necessidade contínua de correção de nitrogênio e fósforo para estimular os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. A ausência de um desses nutrientes pode impedir ou limitar seu crescimento prejudicando a descontaminação (COULON *et al.*, 2007, YU *et al.*, 2005).

São utilizadas duas estratégias principais para que ocorra o processo de biorremediação: bioaumentação e bioestimulação. O processo conhecido como bioaumentação

é baseado em introduzir microrganismos previamente caracterizados como potenciais degradadores de contaminantes no meio. Essa técnica visa aumentar a população microbiana e, como consequência, a taxa de biodegradação (DAS e CHANDRAN, 2011, TYAGI *et al.*, 2012). Já a introdução de nutrientes e/ou fertilizantes inorgânicos no ambiente contaminado com intuito de estimular o crescimento da população microbiana nativa é conhecida como bioestimulação (ROBB e MOYER, 2001). Esse processo promove a transformação de contaminantes presentes na fração petrolífera em outros potencialmente menos tóxicos restaurando esses sistemas e devolvendo suas características originais. Das tecnologias biológicas descritas, o bioestímulo tem sido considerada uma boa alternativa para recuperação de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados (MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004, NAKAGAWA e ANDRÉA, 2006).

ROSA e TRIGUIS (2007) simularam um processo de biorremediação de óleo em areia de praia testando quatro fertilizantes como estimuladores de atividade microbiana de degradação, melação, farinha de peixe, fosfato de amônio e um fertilizante agrícola contendo NPK. Os dois últimos obtiveram melhor resultado promovendo aumento da degradação de óleo, provavelmente devido à baixa disponibilidade de N e P no sistema contaminado e pelo fato dos microrganismos apresentarem preferência pelos outros compostos orgânicos presentes no melação e na farinha de peixe. O fertilizante NPK foi apontado como preferencial, devido ao seu baixo custo, e pelo fato de não gerar toxicidade e estimular o crescimento de populações de microrganismos degradadores. Além disso, por ter alta solubilidade em água, essa fonte de nutrientes não satura o ambiente.

Já OLIVEIRA em 2011 comparou o efeito da adição de fontes de nitrogênio e fósforo solúveis em água e oleofílicas sobre a degradação de petróleo cru por microrganismos nativos ou adicionados em microcosmos de areia de praia. Foi verificado que os nutrientes hidrossolúveis não permaneceram no sedimento, foram

gradualmente lavados pela remoção diária de água, ao passo que os nutrientes oleofilicos tiveram maior permanência no ambiente. No entanto, apesar dessa diferença, a autora não verificou diferenças consideráveis nas contagens microbianas nas duas situações. Além disso, a maior degradação ocorreu nos microcosmos supridos com os nutrientes solúveis e entre os consórcios avaliados os microrganismos naturalmente presentes apresentaram melhores resultados na degradação do óleo.

Sabe-se que uma das principais perdas dos nutrientes no meio ambiente ocorre devido a lixiviação, volatilização e outras instabilidades químicas que podem ocasionar insuficiência de nutrientes reduzindo assim a ação dos microrganismos (HANAFI *et al.*, 2000). Entretanto, a aplicação excessiva de nutrientes pode resultar em uma maior exigência metabólica, e no caso de ambientes aquáticos potencializar impactos como os da eutrofização marinha (DIBBLE e BARTHA, 1979).

Microencapsulação

Com a finalidade de se evitar a perda de nutrientes por processos como volatilização e evitar a eutrofização de ambientes, tem se utilizado a técnica conhecida como microencapsulamento de materiais ativos para introdução desses nutrientes, e dessa forma os nutrientes são fornecidos de maneira lenta ao ambiente (SHAVIV, 2001, BANSODE *et al.*, 2010).

A utilização de fertilizantes de liberação lenta pode realizar um fornecimento contínuo de nutrientes, mantendo um estado nutricional suficiente por meio de uma relação ótima de C:N:P para a manutenção da atividade microbiana e concomitante redução de custos na biorremediação (XU *et al.*, 2003).

A literatura refere o uso de fertilizantes comerciais de liberação lenta em sistemas agrícolas, como por exemplo o osmocote®, produzido utilizando o princípio de microencapsulamento. O osmocote® é composto por nutrientes encapsulados por uma

resina orgânica biodegradável, que proporciona uma liberação de nutrientes gradual por um período de 3 a 4 meses (MENDONÇA *et al.*, 2008).

LIMA *et al.* (2010) avaliaram a degradação de hidrocarbonetos saturados utilizando a técnica de bioestímulo em sedimento de manguezal impactado por atividades petrolíferas, testando a potencialidade de dois fertilizantes (NPK e osmocote®). O monitoramento mostrou condições favoráveis para o processo de biorremediação durante todas as fases de investigação e demonstrou uma maior degradação dos hidrocarbonetos saturados nas unidades com NPK, evidenciando uma melhor eficiência desse fertilizante no processo de bioestímulo testado. No entanto, as unidades tratadas com osmocote® não sofreram modificações significativas durante o experimento.

Na microencapsulação, o material ativo é revestido por uma matriz que é o agente encapsulante. Diversos polímeros e diferentes métodos são utilizados nas técnicas de microencapsulação, o alginato de cálcio é considerado um dos biopolímeros mais adequados para produzir a capsula (BERTOLINI *et al.*, 2001, TONNESEN & KARLSEN, 2002 e ROY, 2005).

Os materiais microencapsulados possuem importantes aplicações principalmente nas indústrias de alimentos, farmacêutica e também no meio ambiente. Na indústria de alimentos funcionam revestindo materiais compostos voláteis e óleos essenciais. A encapsulação desses materiais é possível pois são transformados na forma seca, sendo assim protegidos pelo revestimento contra a evaporação, oxidação, e reações químicas (ROSENBERG *et al.*, 1990). Já na indústria farmacêutica, as microcápsulas são usadas principalmente para aumentar a estabilidade de uma droga ou para modificar ou retardar sua liberação em locais específicos de ação. Por exemplo, substâncias antiinflamatórias, podem ter seu tempo de atuação no organismo aumentado pela microencapsulação, prolongando seu efeito (FINOTELLI, 2002). Por fim, no meio ambiente o microencapsulamento vem sendo utilizado para suprir a

necessidade de alguns nutrientes necessários para o desenvolvimento de plantas e microrganismos no solo. Além disso, o encapsulamento reduz os riscos de toxidez para o homem durante o manuseio de alguns fertilizantes e ao controlar a liberação de nutrientes, diminui o risco de concentrações elevadas no meio ambiente evitando dessa forma o processo de eutrofização (WU, 2008).

Especialmente algas marrons da família *Phaeophyceae* são utilizadas para extração do ácido algínico. A estrutura sequencial do alginato de cálcio (CaAlg) é fundamental para função de agente encapsulante, devido às características de formação de gel, espessamento e de estabilização dessas moléculas (SANTOS, 2014). Devido a estas propriedades, o alginato é também muito utilizado na indústria alimentícia principalmente no preparo de géis para produção de gelatinas e pudins; estabilização de sucos de fruta, bombons e recheios (RHIM, 2004).

Outro material encapsulante largamente comercializado é conhecido como Capsul®. Este produto consiste em um amido de milho ceroso modificado enzimaticamente que resulta em aumento da capacidade e estabilidade de emulsões (FINOTELLI, 2002, MAIA, 2004, SILVA, 2008).

As razões que levam à modificação do amido incluem modificar as características de gelatinização, e a tendência das pastas em formarem géis; aumentar a estabilidade das pastas ao resfriamento e descongelamento, a transparência das pastas ou géis e a adesividade; melhorar a textura das pastas ou géis e a formação de filmes; adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante (SILVA *et al*, 2006).

O Capsul® fornece propriedade emulsificante para óleos essenciais cítricos, óleos vegetais e uma grande variedade de mistura com voláteis. A inclusão de grupamento lipofílico no amido de milho modificado, custar menos e ser usado em menor quantidade (em peso), o torna um substituto de proteínas e da goma arábica

(ABURTO et al., 1998; FINOTELLI, 2002). A presença de grupos hidrofóbicos na estrutura do Capsul® torna este amido menos solúvel à água.

Apesar de constituir-se em um amido modificado, este possui baixa habilidade de formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias deste amido, resultando assim na formação de um filme mais flexível e dessa forma mantendo a biodegradabilidade (MAIA, 2004).

O Capsul® é utilizado pelas indústrias alimentícia e farmacêutica. Caso tenha aprovação do FDA (Food and Drug Administration) pode ser utilizado como um aditivo alimentar, desde que o conteúdo de octenilsuccinato não exceda 3% (MAIA, 2004; BASTOS, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Esse trabalho visa então o desenvolvimento de um produto de liberação lenta de nitrogênio e fósforo para fins de estimular a biodegradação de hidrocarbonetos no sistema ambiental de modo a minimizar os impactos gerados pela presença destes em casos de acidentes, vazamentos ou em casos de tratamento de efluentes nos quais esses contaminantes sejam encontrados.

3.2 Objetivos Específicos

- Produzir cápsulas de liberação lenta de Nitrogênio e Fósforo à base de Alginato e Capsul®;
- Avaliar a biodegradação de um sistema contaminado com óleo combustível, utilizando o produto encapsulado como fonte de N e P no bioestímulo.

4. METODOLOGIA DA PESQUISA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia localizado na Escola de Química, Centro de Tecnologia (CT) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Para realização desse experimento foram utilizados materiais encapsulados preparados com alginato - capsul®, a fim de se promover liberação lenta de nutrientes no ambiente e propiciar a bioestimulação. A escolha do polímero foi feita baseada em um estudo realizado por REIS (2015) no qual foi estudado o melhor polímero de liberação lenta. Para isso, o autor avaliou as seguintes opções de polímero: alginato-capsul®, alginato puro e carboximetilcelulose(CMC) em sistemas contendo água, glicose e microrganismo. O melhor resultado, alginato-capsul®, foi selecionado por apresentar a liberação lenta dos nutrientes de interesse por pelo menos trinta dias de experimento, sendo por isto utilizado neste trabalho.

Com o intuito de se fazer uma comparação com os resultados da liberação lenta realizou-se experimentos simultâneos, nas mesmas condições em que se realizou com o encapsulamento de alginato-capsul®, com o osmocote®. O osmocote® é um produto comercial de liberação lenta que já é utilizado na agricultura e consiste em um composto de nutrientes encapsulados por uma resina orgânica biodegradável que contém proporção de nitrogênio, fósforo e potássio (MENDONÇA *et al.*, 2008). O osmocote® utilizado neste trabalho possui proporção de N:P:K de 10:10:10. Além do experimento com o osmocote® foi conduzido o experimento branco, no qual não foram acrescentados nutrientes, com a finalidade de se avaliar a condição de degradação natural do ambiente. Estes encapsulados foram testados em simulação de um ambiente contaminado por óleo combustível e para esse propósito contaminou-se água com Óleo Combustível MF – 380.

Com intenção de buscar a melhor proporção de nitrogênio e fósforo que proporcionasse a degradação do óleo mais eficiente realizou-se um experimento com planejamento aplicado para testar cinco combinações de diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo, que foram escolhidos baseados em valores utilizados na literatura (OLIVEIRA,2005 e MILLIOLI, 2007) e com auxílio do Programa **Software Statística 7.0**.

Os valores utilizados no Experimento (Exp) 2 estão baseados na melhor relação nutricional encontrada por OLIVEIRA,2005 e também, a que foi utilizada por MILLIOLI, 2007. Já o Exp 3 simula as proporções de Nitrogênio e Fósforo já citadas do osmocote®, composto de nutrientes encapsulados comercializado. A partir desses dois valores de referência e com auxílio do Programa **Software Statística 7.0** foi possível obter as proporções utilizadas nos Exp 1, Exp 4 e Exp 5. A seguir, são apresentadas as proporções na Tabela 1:

Tabela 1: Proporções de Nitrogênio e Fósforo dos experimentos testados

Relação N:P	
Experimento 1	10:01
Experimento 2	15:01
Experimento 3	10:10
Experimento 4	15:10
Experimento 5	12,5:5,5

No total foram realizados sete experimentos (cada um deles conduzido separadamente), que testaram a liberação de nutrientes e degradação nas cinco proporções de Nitrogênio e Fósforo citadas acima, no osmocote® e na ausência de nutrientes.

Reagentes e Meio de Cultivo

O meio de cultivo utilizado foi a água da Baía de Guanabara coletada no píer próximo ao restaurante Sirí da Ilha, localizado na Praia do Galeão, 01- Galeão, Rio de Janeiro. A escolha da água foi baseada em estudos realizados anteriormente que mostram que locais onde ocorrem frequentes vazamentos criam uma biota que possui uma “memória biológica” tornando mais eficaz a remoção de contaminantes (MENEGETTI,2007). Portanto, a microbiota previamente exposta é capaz de biodegradar diferentes frações do óleo derivado de petróleo, tornando maiores as chances de que ocorra a degradação do óleo combustível.

A faixa de pH ideal para que microrganismos apresentem atividade máxima está entre 6,5 e 8,5 (ANDRADE *et al.*,2010). Como o pH da água utilizada foi de 8,3 pode-se concluir que o pH está adequado para que o processo de biorremediação aconteça. A quantidade de nitrogênio total na água foi de 8,3 mg/L e de fósforo total 1,3 mg/L.

A seguir segue lista com os materiais utilizados para realização deste trabalho:

- **Capsul®**

Foi utilizado no experimento o amido de milho ceroso enzimaticamente modificado da empresa *National Starch and Chemical Corporation* dos Estados Unidos.

- **Alginato de Sódio®**

O alginato utilizado é derivado de algas e foi adquirido na indústria Proquímios.

- **Cloreto de cálcio**

O sal citado acima é da marca Vetec, produzido pela indústria Química Fina LTDA.

- **Nitrato de amônio**

O sal citado acima é da marca Merck.

- **Fosfato de potássio monobásico**

O sal citado acima é da marca Reagen.

- **Fosfato de potássio bibásico anidro**

O sal citado acima é da marca Synth.

- **Sulfato de sódio**

O sulfato de sódio P.A, utilizado foi adquirido na indústria Proquímios.

- **Hexano**

O hexano utilizado como solvente foi o N-hexano 95% da marca TEDIA, o qual possui grau HPLC/ Spectro.

- **Óleo**

Óleo Combustível MF 380

- **Fertilizante Inorgânico (osmocote®)**

Foi utilizado no experimento o fertilizante osmocote® de proporção de N:P:K de 10-10-10 da marca Ultraverde, (Bonigo Indústria e Comércio LTDA.), de composição apresentada na Tabela 2 ae seguir:

Tabela 2: Composição do osmocote®

Composição	Concentração (g/L)
Nitrogênio Total	120,0
P ₂ O ₅	120,0
K ₂ O	120,0

Produção de cápsulas de liberação lenta

Com o objetivo de se chegar às relações de N:P citadas na Tabela 1 foram utilizados os seguintes sais:

- 1) nitrato de amônio (NH₄NO₃);
- 2) fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄);
- 3) fosfato de potássio bibásico anidro (K₂HPO₄).

Sendo o nitrato a fonte de nitrogênio e os fosfatos a fonte de fósforo. Utilizou-se dois fosfatos como fonte de fósforo pois são as fontes usadas com mais frequência nos experimentos de bioestímulo e também para comparar com meio mineral BH (Bushnell Hass), que é um meio de cultivo de composição conhecida e é o meio utilizado nos experimentos de biorremediação e cultivo de espécies degradadoras de hidrocarbonetos, que segue na Tabela 3:

Tabela 3: Composição do meio mineral Bushnell Hass

Composição	Concentração
Sulfato de Magnésio	0,2 g/L
Cloreto de Cálcio	0,02 g/L
Fosfato Monopotássico	1,0 g/L
Fosfato Dipotássico	1,0 g/L
Nitrato de Amônio	1,0 g/L
Cloreto de Ferro III	0,05 g/L

Em cada experimento foi utilizado 6g de alginato de sódio, 8 g de capsul® e aproximadamente 200mL de água destilada. A quantidade de sais utilizada em cada experimento está discriminada na Tabela 4 a seguir:

Tabela 4: Massa dos compostos utilizados nas cápsulas

Composto	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5
Nitrato de Amônio	1,164 g	1,164 g	1,752 g	1,752 g	1,440 g
Fosfato de Potássio Monobásico	0,086 g	0,792 g	0,0864 g	0,792 g	0,432 g
Fosfato de Potássio Bibásico Anidro	0,110 g	0,996 g	0,110 g	0,998 g	0,552 g

Inicialmente, os sais de nitrato de amônio (NH_4NO_3), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e fosfato de potássio bibásico anidro (K_2HPO_4) foram dissolvidos em pequena quantidade de água destilada. Após essa etapa, se acrescentou o capsul® e por último o alginato. A água destilada foi acrescentada aos poucos. Essa solução foi agitada no mixer por aproximadamente meia hora gerando uma solução viscosa que foi reservada.

Após essa etapa, para a formação das cápsulas, a solução viscosa, recém-preparada, foi gotejada na solução de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dihidratado a 0,3M, conforme ilustra a Figura 1 a seguir. A fase líquida foi drenada em peneira, com a finalidade de separação das cápsulas e a retirada do excesso de água, conforme é ilustrado na Figura 2 e reservadas em placas de petri revestidas com papel, também para absorver umidade.



Figura 1: Gotejamento da solução experimental no cloreto de cálcio, para obtenção das esferas do produto encapsulado



Figura 2: Cápsulas formadas após o gotejamento

Execução do experimento:

Foram adicionados 200 mL de água, proveniente da Baía de Guanabara, em cada erlenmeyer, e em seguida contaminada com 2g/L de óleo combustível, ou seja 0,4g de óleo (aproximadamente 25 gotas). Após isso foram acrescentados o material encapsulado com diferentes concentrações e osmocote® em cada frasco correspondente ao experimento e as quantidades são apresentadas a seguir na Tabela 5:

Tabela 5: Massa do encapsulado utilizado em cada experimento

Experimento	Massas
Exp 1	12,11 g
Exp 2	11,20 g
Exp 3	11,13 g
Exp 4	11,49 g
Exp 5	12,84 g
Branco+micro	-
Osmocote®	0,26 g

O experimento foi realizado em duplicata. Cada frasco recebeu a quantidade acima citada e foi reservada no laboratório conforme Figura 3.

**Figura 3: Frascos do experimento dispostos no laboratório**

Os experimentos foram analisados com 0h, 15 dias e 30 dias. Os parâmetros analisados foram os resultados da degradação do óleo combustível, quantidade de proteínas e quantidades remanescentes de nutrientes.

Determinações Analíticas:

I) Análise de proteína total

A análise de proteína foi realizada para indicar um possível aumento de crescimento microbiano e para isso foi utilizado o método de Lowry e colaboradores. Esse método é baseado em uma mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (Reagente Folin-Ciocalteu da fluka). Essa mistura sofre redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e dessa forma, gera um produto com cor, que pode ser lido com auxílio de um espectrofotômetro (LOWRY *et al.*, 1951).

A preparação da amostra para leitura seguiu o protocolo descrito a seguir. Separou-se um volume de 7 mL de amostra que foi centrifugada em tubos falcon por 30 minutos com rotação 3500 rpm. O sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 2 mL de solução salina e homogeneizadas em vortex.

Foi separado 1 mL da solução de 2 mL e colocado em um microtubo adicionando-se 0,1mL de solução NaOH a 1M. Em seguida, a solução é homogeneizada e colocada em banho-maria a 100 °C durante 10 minutos. Após a hidrólise, a solução foi centrifugada a 10000 rpm durante 20 minutos.

Para a realização da dosagem transferiu-se 500µL do sobrenadante, que foram obtidos na centrifugação, para tubos de vidros e acrescenta-se 2mL do reagente A durante 10 minutos. A seguir, adiciona-se 0,2mL do reagente B por durante 30 minutos. Após esse tempo faz-se a leitura em espectrofotômetro a 660nm. O espectrofotômetro

foi zerado com um branco, feito com água destilada no lugar da amostra, que foi preparado da mesma forma descrita acima.

Seguem as composições dos reagentes utilizados:

- **Reagente A:**

Solução alcalina estoque - 2% de Na_2CO_3 (p/v) e solução de NaOH 0,1 mol/L

Solução de tartarato de sódio e potássio 2% (p/v)

Solução de Sulfato cúprico pentahidratado 1% (p/v).

- **Reagente B:**

Solução de Folin Ciocalteu's diluído em água destilada 1:1.

Para que fosse relacionada a absorvância das amostras com a concentração de proteínas foi necessário construir uma curva padrão de uma proteína com concentração conhecida (BSA – albumina bovina). As diferentes concentrações de BSA foram submetidas às reações do Método de *Lowry*, para obter a curva Absorvância versus Concentração proteica.

II) Análise de Nitrogênio

As análises de Nitrogênio total foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Ambiental, localizada na Escola de Química – UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro), com auxílio do aparelho TOC-VCPN Total *Organic Carbon Analyzer*, modelo TNM-1 da SHIMADZU®.

O aparelho utilizado na quantificação de nitrogênio total possui um *software* próprio que constrói a curva de calibração a partir de dados do padrão inseridos. À medida que

as amostras foram analisadas, o aparelho forneceu os dados de nitrogênio total em mg/L.

III) Análise de fósforo

As amostras de fósforo inorgânico foram analisadas com auxílio do *kit* colorimétrico comercial, da marca *doles*, para determinação de ortofosfato. Na técnica utilizada os íons ortofosfato formam com íons molibdato, em solução sulfúrica, ácido molibdato fosfórico. Este último, com ácido ascórbico, se reduz a azul de fosfomolibdenio que se determina fotométricamente em comprimento de onda de 690nm.

Foi necessário construir uma curva padrão de K_2HPO_4 (fosfato de potássio dibásico anidro) para poder relacionar a absorbância das amostras com a concentração de fosfato. As diferentes concentrações em mg/L de K_2HPO_4 foram submetidas às reações do Kit para análise de fosfato, o que resultou em uma curva de Absorbância *versus* Concentração de fosfato que foi posteriormente convertida em fósforo.

IV) Análise de degradação do óleo

O equipamento utilizado para realizar as análises de degradação do óleo foi o TOG/HTP *Analyzer Infracal*, modelo HART-T localizado no CETEM. Para a análise do óleo ser feita no aparelho, a fração oleosa da mistura, o óleo combustível, deve ser extraída da solução experimental. Para isso, utilizou-se um protocolo de extração com hexano que segue as etapas que serão apresentadas a seguir.

Primeiramente, acrescenta-se 30 mL de hexano no erlenmeyer do experimento e agita-se. Em seguida, esse conteúdo é despejado em um balão de separação fechado e é agitado durante 2 minutos. Após agitação, o balão é apoiado e a mistura permanece

dessa forma durante 10 minutos. Ao fim deste tempo, a água deve estar separada da parte oleosa sendo então descartada em um recipiente. São adicionados mais 30 mL de hexano no erlenmeyer, a fim de retirar o óleo remanescente das paredes do recipiente de vidro. Esse conteúdo é despejado no balão de separação, junto com a parte oleosa, e repete-se a operação, agita-se por mais 2 minutos e aguarda-se mais 10 minutos para que ocorra a separação das fases, conforme ilustrado na Figura 4.



Figura 4: Procedimento de extração de óleo da solução experimental

Descarta-se a água novamente e o conteúdo oleoso restante é transferido para o erlenmeyer onde foi realizado o experimento e são acrescentados, aproximadamente, três espátulas de Sulfato de sódio anidro Na_2SO_4 que possui a finalidade de retirar o excesso de água. Embora parte dos nutrientes tenha sido consumido pelos microrganismos, parte do polímero ainda se encontra na mistura e deve ser removido para que o óleo seja separado. Para isso coloca-se algodão em um funil e a mistura

deve passar por esse algodão, para que o sulfato de sódio anidro e o polímero que ainda se encontra na mistura fique retido no algodão. O algodão é descartado e o líquido filtrado é despejado em um vidro âmbar e armazenado para futura análise.

A degradação do óleo foi analisada com TPH (“*Total Petroleum Hydrocarbon*”) que concede a concentração dos hidrocarbonetos totais presentes na amostra. Como existem muitas substâncias químicas presentes no petróleo e seus derivados, é mais viável medir a concentração total de hidrocarbonetos nessa área utilizando para efeitos de avaliação e monitoração o parâmetro TPH do que medir cada uma dessas substâncias separadamente para efeito de monitoramento do progresso da remediação de uma área contaminada (LAMBERT, *et al.*, 2001).

Inicialmente, a amostra de óleo (que foi reservada no âmbar) foi diluída na proporção de 1:10 (uma parte da amostra para 10 de hexano) e foi reservada. Após isso, foi passado hexano três vezes no aparelho e limpando com lenço de papel para limpar o aparelho. O valor que deve aparecer no visor deve ser entre 1116 e 1127. Caso apareça um valor diferente, deve-se continuar limpando. Após isso, é necessário zerar o aparelho para colocar a amostra diluída no aparelho que irá fornecer um valor.

Para poder relacionar a absorvância das amostras com a concentração de TPH, foi utilizada uma curva padrão do mesmo óleo empregado neste trabalho. Diferentes concentrações em mg/L de óleo foram analisadas, o que resultou em uma curva Absorvância *versus* Concentração de óleo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados de Nitrogênio, Fósforo e Proteínas são apresentados na tabela a seguir:

Tabela 6: Análise das concentrações de nutrientes e proteínas ao longo de 30 dias

Experimentos	Nitrogênios totais (mg/L)			Fósforos totais (mg/L)			Proteínas totais (mg/L)		
	Tempo								
	0 dia	15 dias	30 dias	0 dia	15 dias	30 dias	0 dia	15 dias	30 dias
Atenuação Natural	8,32	4,03	2,67	1,3	0,57	0,32	21,01	51,13	77,28
Osmocote® (10:10)	7,47	32,73	41,35	3	4,46	1,05	25,76	101,06	220,74
Exp 1 (10:1)	10,9	25,55	43,73	3,24	6,89	1,78	24,18	83,23	193,4
Exp 2 (15:1)	17,08	22,65	29,06	6,65	17,35	8,59	29,84	89,26	132,28
Exp 3 (10:10)	15,3	26,56	19,3	3,24	4,71	2,27	27,35	64,2	217,03
Exp 4 (15:10)	16,2	24,6	14,89	3	11,03	3	26,07	121,67	232,63
Exp 5 (12,5 :5,5)	14,19	25,16	19,19	3,24	12,48	3,49	29,375	69,75	197,06

Com base nos resultados apresentados na Tabela 6 acima, foram elaborados gráficos a fim de facilitar a visualização dos resultados e são apresentados a seguir.

A quantificação de proteínas, que indica o crescimento microbiano, pode ser verificada na Figura 5 apresentada a seguir. A maior quantidade de proteína, 232,63 mg/L, foi verificada no Experimento 4, que também apresentou a maior degradação de óleo como será visto adiante. A população de microrganismos presentes nesse experimento foi a que mais cresceu e por isso provavelmente foi capaz de promover maior degradação do óleo.

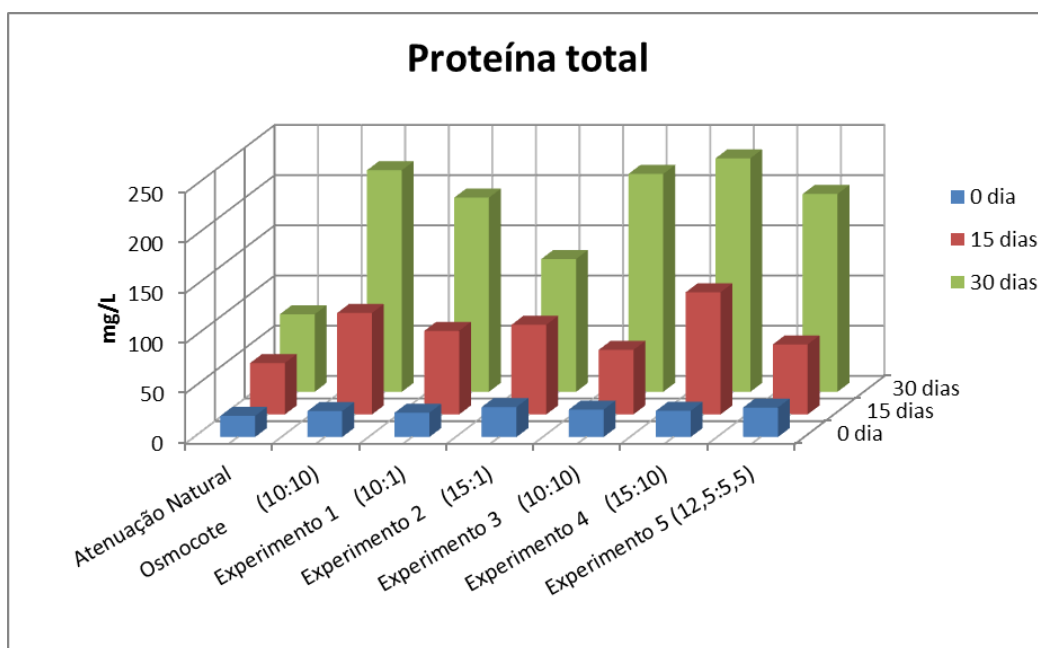


Figura 5: Teor de proteínas (mg/L)

A segunda maior quantificação de proteínas, 220,74 mg/L, ocorreu no experimento realizado com osmocote®, que obteve o segundo resultado de degradação. Além disso, o experimento 3 desenvolvido com a proporção de 10:10 (mesma proporção do osmocote®), obteve resultado semelhantes tanto de degradação como de proteínas, 217,03 mg/L.

A menor quantificação de proteínas, 77,28 mg/L, ocorreu no experimento sem adição de nutrientes, indicando menor degradação do óleo.

Pela legislação federal, a Resolução CONAMA 430 de 2011, o nitrogênio amoniacal é um dos parâmetros inorgânicos usado como padrão de emissão de efluentes nos corpos de água, para isso faz-se necessário atender um limite de 20 mg-N/L. De acordo com a Figura 6 a seguir, é possível perceber que ao final de 30 dias, os experimentos Branco (2,67 mg/L), Exp. 3 (19,3 mg/L), Exp 4 (14,89 mg/L) e Exp 5 (19,19 mg/L) se encontram dentro deste padrão, enquanto que os experimentos com osmocote®, Exp 1 e Exp 2 estão acima. No entanto, como não houve degradação total do óleo, esses nutrientes ainda podem estimular o crescimento de microrganismos podendo gerar maior porcentagem de degradação em um maior intervalo de tempo.

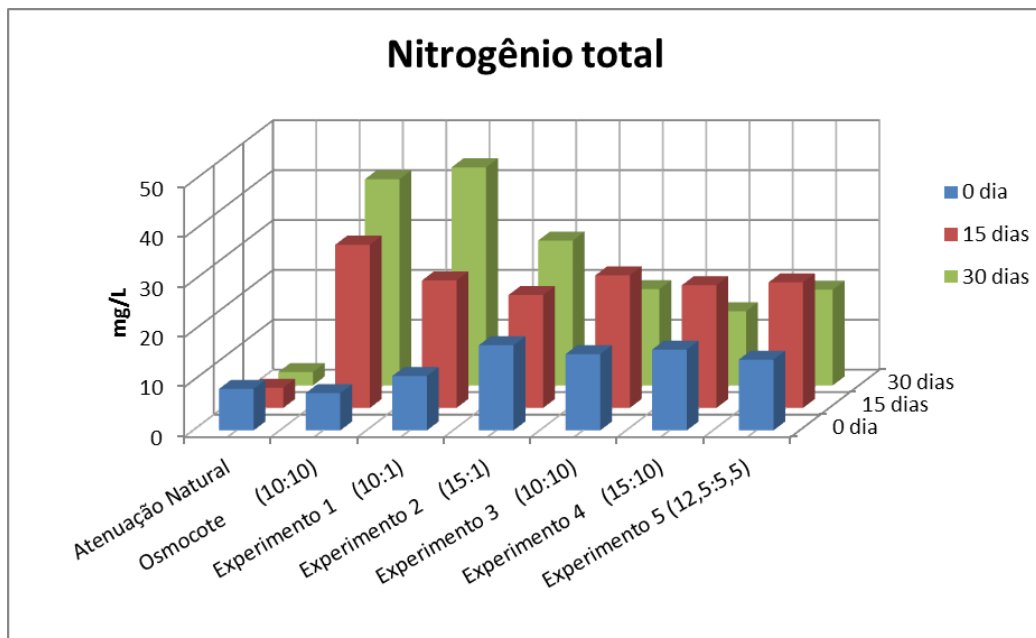


Figura 6: Teor de nitrogênio (mg/L)

A Resolução 430 do CONAMA de 2011 para lançamentos de efluentes em corpos de água, não apresenta padrão de lançamento de Fósforo total, para que a comparação possa ser feita, utilizemos os limites para a concentração de fósforo total em águas naturais, em função da forma em que ocorre o escoamento. Os ambientes lóticos são relativos às águas continentais moventes e os lênticos, à água parada, com movimento lento ou estagnada. Assim, para águas doces de classes 1 e 2, quando o nitrogênio for fator limitante para eutrofização, nas condições estabelecidas pelo órgão ambiental competente, o valor de fósforo total não deverá ultrapassar 1,27 mg/L para ambientes lênticos e 2,18 mg/L para ambientes lóticos. Vale lembrar que o disposto acima não se aplica às baías de águas salinas ou salobras.

Dessa forma, foi possível perceber de acordo com a Figura 7, que após 30 dias a quantidade de fósforo remanescente nos experimentos atenuação natural, osmocote® e Exp 1 estão dentro do padrão citado acima, enquanto que os demais experimentos apresentam valores maiores que o estabelecido. Mas cabe ressaltar, que da mesma forma que a concentração de nitrogênio ainda pode contribuir para aumentar a degradação, ocorre o mesmo com as concentrações de fósforo.

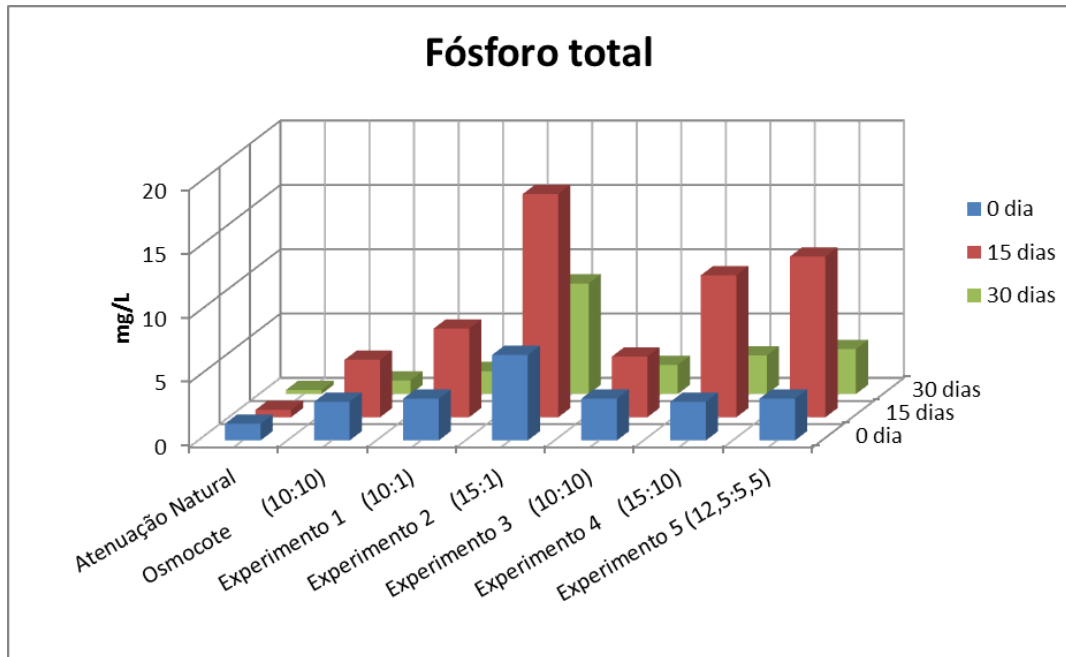


Figura 7: Teor de fósforo (mg/L)

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa realizados com consórcio microbiano em meio mineral, baseado nas mesmas concentrações do BH (Bushnell Haas), com os encapsulados de alginato e capsul® e contaminados com óleo, apresentaram altas concentrações de Fósforo em torno de 50 mg/L em 240 dias, sendo superior ao padrão estabelecido pelo CONAMA (REIS,2009).

Com base nos resultados apresentados na Figura 8 abaixo, foi possível perceber que a degradação ocorreu em diferentes combinações da relação N:P, já que a quantidade de óleo foi fixa. Uma boa relação foi obtida com o produto encapsulado na condição 4, onde foi obtida a maior taxa de degradação média do óleo, 62,03%.

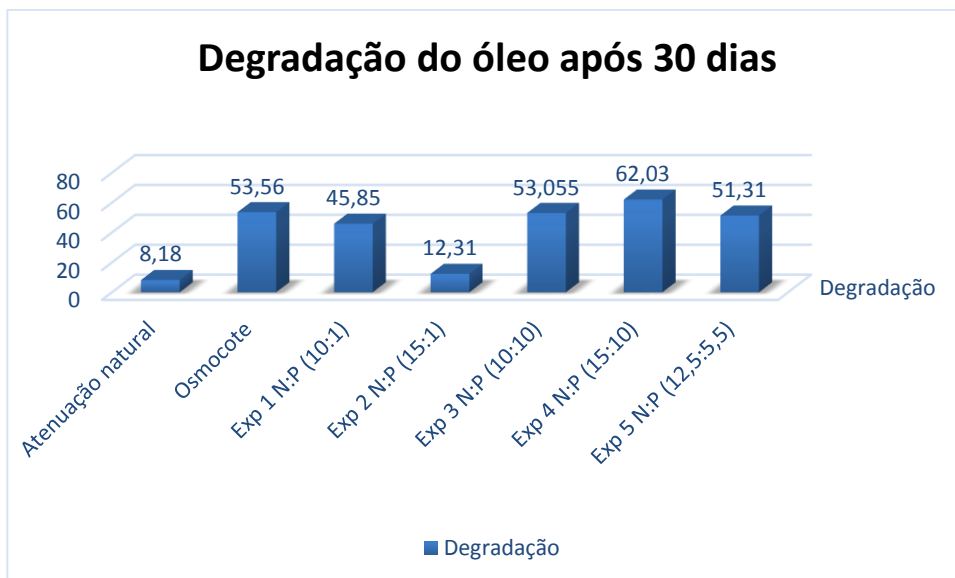


Figura 8: Degradação do óleo combustível em porcentagem após 30 dias

Como não foram encontrados estudos de degradação utilizando água como sistema de tratamento, para que a comparação fosse possível, buscou-se trabalhos de solos contaminados. RIZZO (2008) avaliou o percentual de degradação de óleo em meio líquido, aplicando um consórcio degradador e utilizando biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo, e apresentou taxa de degradação de 23% em trinta dias de experimento.

O experimento conduzido com osmocote®, produto comercial utilizado na área agrícola, contendo também N e P imobilizados, teve uma boa resposta na degradação (55,06 %), mas inferior ao produto desenvolvido e semelhante ao Exp 3, que possui mesma proporção de nutriente que o osmocote®. Já o experimento sem nutrientes, obteve 8,18% percentual de degradação, sendo o menor resultado encontrado, indicando dessa forma os efeitos benéficos do bioestímulo.

Pode-se detectar que o produto desenvolvido foi, portanto, comparável ao produto comercial na relação N:P de 10:10 e apresentou melhor desempenho na relação 15:10. Somado a este fato pode-se acrescentar ainda que o produto desenvolvido

manteve a concentração de N disponível dentro dos limites da legislação, embora isso não tenha ocorrido para o P. Possivelmente teria ainda que ser melhor “otimizada” essa relação de modo a evitar essa liberação excessiva de P ou o experimento poderia ser conduzido por mais tempo, o que poderia permitir maior degradação e portanto menor teor residual de P.

Salienta-se ainda que a aplicação do produto em questão deverá ser otimizada para cada situação dependendo do tipo de sistema, como por exemplo solo ou água, presença e concentração da biota e concentração do contaminante, uma vez que pretende-se atingir uma relação ideal de C:N:P para permitir a atuação adequada da biota natural na detoxificação do ambiente.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível produzir cápsulas de liberação lenta regular com diâmetro de aproximadamente 4mm.
- ✓ O experimento de atenuação natural obteve degradação de 8,18% enquanto que a menor degradação com bioestímulo foi de 12,03% em 30 dias de experimento.
- ✓ Obteve-se um produto encapsulado, numa relação de Nitrogênio e Fósforo de 15:10 que permitiu uma liberação lenta desses nutrientes e promoveu uma boa taxa de degradação (62,03%) em 30 dias de experimento.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Tentar otimizar a relação N:P ou conduzir o experimento por um tempo maior que 30 dias para verificar maior degradação ou menor teor residual de P.
- ✓ Utilizar as cápsulas a base de alginato e capsul® na liberação lenta de nutrientes para a biorremediação de outros sistemas líquidos, solos e sedimentos.
- ✓ Utilizar matrizes separadas para fonte de nitrogênio e fósforo.
- ✓ Analisar quais microrganismos foram responsáveis por essa degradação.
- ✓ Verificar a absorção de óleo pelas cápsulas em solução salina sintéticas sem microrganismos.
- ✓ Verificar a taxa de liberação dos nutrientes em água do mar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, J. A., AUGUSTO, F., JARDIM, I. C. S. F., 2010, "Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados", *Eclética Química*, v. 35, n. 3.
- ARBURTO, L. C.; TAVARES, D. Q.; MARTUCCI, E. T., 1998, "Microencapsulação de óleo essencial de laranja", *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 1, pp. 45-48.
- BANAT, I.M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., MARTINOTTI, M.G., FRACCHIA, L., SMYTH, T.J.P., MARCHANT, R., 2010, "Microbial biosurfactants production, applications and future potential", *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 87, pp. 427-444.
- BANSODE, S. S., BANARJEE, S. K., GAIKWAD, D. D., JADHAV, S. L. & THORAT, R. M., 2010, "Microencapsulation: a review", *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v.1, n.2, pp. 38-43.
- BASTOS, D. S. 2007 *Produção e caracterização de filme alimentício com antioxidante aprisionado*. M.Sc. dissertação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- BERTOLINI, A. C., SIANI, A. C., GROSSO, C. R. F., 2001, Stability of monoterpenes of encapsulated in gum arabic by spray-drying", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 2, pp. 780-785.
- BRAGA, B.; HESPANHOL, I., CONEJO, J. G. L., BARROS, M. T. L. de, SPENCER, M., PORTO, M., NUCCI, N., JULIANO, N., EIGER, S., 2002 **Introdução à engenharia ambiental**. 2 ed. São Paulo, Prentice Hall.
- CAMERINI, C.S. *et al.*, *Relatório de Análise e Verificação do Projeto e Montagem do Duto PE-II na Baía de Guanabara*. Relatório Técnico, 2000.
- COULON, F., MCKEW, B. A., OSBORN, A. M., MCGENITY, T. J., TIMMIS, K. N., 2007, "Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters", *Environmental Microbiology*, v. 9, n. 1, pp. 177-186.
- CONAMA, **Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº 357, de 17 de março de 2005** (on-line). Disponível em: <www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf> Acesso em 30/01/2015.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução n° 430, de 13 de maio de 2011 (on-line). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>> Acesso em 30/01/2015.

CRUZ, J.F., 2012, *Avaliação da eficiência de surfactantes no processo de biodegradação de petróleo bruto em simulações de derrames no mar*. M.Sc. dissertação, Universidade Federal da Bahia, Bahia.

DAS, N., CHANDRAN, P., 2011, "Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview", *Biotechnology Research International*, v. 2011, Article ID 941810, 13 pages.

DIBBLE, J.T. e BARTHA, R., 1979, "Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge", *Applied and Environmental Microbiology* v. 37 pp. 729-739.

EPA - Environmental Protection Agency of United States, 2008. *Water Quality Assessment and Total Maximum Daily Loads Information*. Office of Water, U.S., Washington, DC. Disponível em: <<http://www.epa.gov/waters/ir/>> Acesso em: 29.01.2015.

FELLENBERG, G., *et al* 1980, "Introdução aos problemas da poluição ambiental", São Paulo: EPU: Springer: Ed. da Universidade de São Paulo.

FINOTELLI, P.V., 2002, *Microencapsulação de Vitamina Antioxidante*. M.Sc. dissertação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FUJIMOTO, J., 2002, "Formação de Multicamadas de Polissacarídeos e Proteínas", *Química Nova*, v. 25, n.5, pp. 757-761.

GAFAROV, A.B., PANOV, A.V., FILONOV, A.E., BORONIN, A.M., 2006, "Change in the composition of a bacterial association degrading aromatic compounds during oil sludge detoxification in a continuous-flow microbial reactor" *Applied Biochemistry Microbiology*, v. 42, pp.160-165.

HANAFI, M. M., ELTAIB, M. S., AHMAD, M. B., 2000, "Physical and chemical characteristics of controlled release compound fertilizer", *European Polymer Journal*, v. 36, pp. 2081-2088.

International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF). 2014. *Major oil spills*. Disponível em: <
http://www.itopf.com/fileadmin/data/Documents/Company_Lit/Oil_Spill_Stats_2014_FINALlowres.pdf> Acesso em: 02/02/2015.

JANBANDHU, A., FULEKAR, M.H., 2011, "Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment", *Journal Hazardous Materials*, v. 187, pp. 333-340.

KASSAI, Y., TAKAHATA, Y., THOSHIHIRO, H., KAZUYA, W., 2005, "Physiological and molecular characterization of a microbial community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil", *Environmental Microbiology*, v. 10.111, pp. 1462-2920.

LAMBERT, P., FINGAS, M., GOLDTHORP, M., 2001, " An evaluation of field total petroleum hydrocarbon (TPH) systems", *Journal of Hazardous Materials*, v.83, n.1-2, pp. 65-81.

LIMA, D.F., OLIVEIRA, O.M.C, CRUZ, M.J., TRIGÜIS, J.A., QUEIROZ, A.F., 2010, "Biorremediação em Sedimentos Impactados por Petróleo na Baía de Todos Os Santos, Bahia: Avaliação da Degradação de Hidrocarbonetos Saturados". In: anais do congresso *Rio Oil & Gas Expo and Conference*, Rio de Janeiro.

LIN, C.W., CHEN, L.H., YET-POLE, I., LAI, C.Y., 2010, "Microbial communities and biodegradation in lab-scale BTEX-contaminated groundwater remediation using an oxygen-releasing reactive barrier", *Bioprocess Biosystems Engineering*, v. 33, pp. 383-391.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951, "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, pp. 265-275.

MAIA, L. H., 2004, *Microencapsulação de Lactoferrina Bovina (bLF) por Spray Drying*, D.Sc. tese, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MAZZEO, D.E.C., FERNANDES, T.C.C., MARIN-MORALES, M.A., 2011. "Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process", **Chemosphere**, v. 85, pp. 13-18.

MENDONÇA, V., ABREU, N. A. A., SOUZA, H. A., TEIXEIRA, G. A., HAFLE, O. M., RAMOS, J., 2008, "Diferentes Ambientes e Osmocote® na produção de mudas de tamarindeiro (*Tamarindus indica*)", **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, pp. 391-397.

MENEGHETTI, L.R.R. 2007. *Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel*. M.Sc., dissertação, Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul.

MILLIOLI, V., S., SOBRAL, E. F. S. L. S., CARVALHO, D. D., 2007, Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: *Avaliação da adição de ramnolipídio quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação*. 4º Congresso Brasileiro de P&D em petróleo e gás. Campinas, SP.

MOLINA-BARAHONA, L., RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R., HERNÁNDEZ-VELASCO, M., VEJA-JARQUÍN, C., ZAPATA-PÉREZ, O., MENDOZA-CATÚ, A., ALBORES, A., 2004, "Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues". **Applied Soil Ecology**, v.27, pp. 165-175.

NAKAGAWA, A.R.; ANDRÉA, M.M, 2006, "Efeito de Alterações nas Características do solo sobre a Degradação de Hexaclorobenzeno", **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 30, pp. 575-582.

OESP, 2000 e 2013. O Estado de São Paulo. ISSN: 1516-294-X. Diário, São Paulo, SP.

OLIVEIRA, F., R., MILLIOLI, V., S., 2005, Utilização da técnica de bioestímulo, avaliando-se parâmetros como relação nutricional e umidade na biorremediação de solo contaminado com óleo cru. XIII Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral, RJ.

OLIVEIRA, C.G.B., 2011, *Utilização de fontes oleofílicas de nitrogênio e fósforo para biorremediação de petróleo em areia de praia*. M.Sc. dissertação, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

REIS, E. A., 2009, Produção de cápsulas de liberação controlada para fins de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos do petróleo. M.Sc., dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

REIS, E. A., 2015 *Imobilização de nitrogênio e fósforo em diferentes matrizes poliméricas para uso na biorremediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo*. D.Sc. tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

RHIM, J., 2004, "Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films", ***Lebensmittel Wissenschaft & Technologie***, v. 37, pp. 323-330.

RIZZO, A.C.L. 2008, *Desenvolvimento De Biorreator Não Convencional Para O Tratamento De Solos Contaminados Por Petróleo*, Ph.D, tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

ROBB, J. e MOYER, E., 2001, "Natural attenuation of benzene and MTBE at four midwestern retail gasoline marketing outlets". ***Contamination. Soil Sed. Water***, Spring, pp. 67-71.

ROSA, A. P., TRIGUIS, J.A., 2007, "Bioremediation processo on Brazil shoreline Laboratory experiments", ***Enviromental Science and Pollution Research***, v.14, n. 7, pp. 470-476.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J. & TALMON, Y., 1990, "Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials" ***Journal Agricultural Food Chemicals***, v.36, pp. 1288-1294.

ROY, I *et al.*, 2005, "Cross-linked alginate-guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalina", ***Biochemical Engineering Journal*** v. 23, pp. 193-198.

SANTOS, M.K., 2014, *Encapsulação de alginato, alginato-quitosana e estudos de estabilidade e liberação controlada em função do pH*. Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química, Universidade Federal do ABC, São Paulo.

SHAVIV, A., 2001, **Advances in controlled-release fertilizers**. In: *Advances in Agronomy*, 1-49. Edited by Donald Sparks, Newark, USA.

SILVA, G. O.; TAKIZAWA, F. F.; PEDROSO, R. A. *et al.*, 2006, "Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil", ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, v. 26, n. 1, pp.188-197.

SILVA, R. F., 2008 Estratégias de Bioestímulo de Sedimento de Manguezal Contaminado com Hidrocarbonetos empregando Fertilizantes de Liberação Lenta. M.Sc., dissertação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro.

SINGH, C., LIN, J., 2008, "Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa" ***African Journal Biotechnology***, v. 7, n. 12, pp. 1927-1932.

TONNESEN, H.H., KARLSEN, J., 2002, "Alginate in drug delivery systems" ***Drug Development and Industrial Pharmacy***, v. 28, n. 6, pp. 621-30.

TYAGI, M., FONSECA, M.M.R., CARVALHO, C.C.C.R., 2011, "Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes", ***Biodegradation***, v. 22, pp. 231-241.

UBANI, O., ATAGANA, H.I., THANTSHA, M.S., 2013, "Biological degradation of oil sludge: a review of the current state of development" ***African Journal Biotechnology***, v. 12, n. 47, pp. 6544-6567.

VAN HAMME, J.D., SINGH, A., WARD, O.P., 2003, "Recent advances in petroleum microbiology", ***Microbiology Molecular Biology***, n. 67, pp. 503-549.

WU, L., LIU, M., RUI, L., 2008, "Preparation and properties of a double-coated slow-release NPK compound fertilizer with superabsorbent and water-retention", ***Bioresource Technology***, v. 99, n. 3, pp. 547-554.

XU, R., OBBARD, J. P., TAY, E.C.T., 2003, "Optimization of a slow release fertilizer dosage for bioremediation of oil-contaminated beach sediment in a tropical environment", ***World Journal o Microbiology & Biotechnology***, v. 19, pp. 719-725.

YU, K. S., WONG, A. H., YAU, K. W., WONG, Y. S., TAM, N. F., 2005 "Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic

aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments”, *Marine Pollution Bulletin*, v. 51, n. 8-12, pp. 1071-1077.

YEUNG, C.W., Law, B.A., Milligan, T.G., Lee, K., Whyte, L.G., Greer, C.W., 2011. “Analysis of bacterial diversity and metals in produced water, seawater and sediments from an offshore oil and gas production platform”, *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, pp. 2095-2105.

ZHU, X., VENOSA, A. D., 2005, “Guidance for the bioremediation of marine shorelines and freshwaters”. *In*: Fingerman, M. (Ed.); Nagabhushanam, R. (Ed.) **Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystem**. Plymouth: Science Publishers, Inc, Cap. 5, pp. 141-172.