



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

Avaliação do Consumo de Petróleo Utilizando *Yarrowia lipolytica*

Claudia Vieira de Medeiros
Renata de la Vega Nascimento
Roberta dos Reis Ribeiro

Projeto de Final de Curso

Orientadores:

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc
Priscilla Filomena Fonseca Amaral, M.Sc

Setembro de 2007

AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE PETRÓLEO UTILIZANDO *Yarrowia lipolytica*

***Claudia Vieira de Medeiros
Renata de la Vega Nascimento
Roberta dos Reis Ribeiro***

Projeto de final de curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

Elioni Maria de Arruda Nicolaiewsky – D.Sc.

Magali Christe Cammarota – D.Sc.

Ana Iraidy Santa Brígida – M.Sc.

**Rio de Janeiro, RJ- Brasil
Setembro de 2007**

“Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações.”

Vinícius de Moraes

Agradecimentos - Roberta

A Professora Maria Alice Zarur Coelho, orientadora deste trabalho, o meu sincero agradecimento não apenas a orientadora eficiente, mas à presença humana e científica inesquecível, capaz de polarizar convergências, agregar e somar capacidades, preenchendo o modelo de mestre e orientador.

Minha estimada orientadora e grande amiga Priscilla, meus mais profundos agradecimentos, pelo seu papel profissional como minha orientadora, mas também pelo exemplo de pessoa que você é: sempre educada, competente, ética e amiga. Muito obrigada pela confiança.

À minha vizinha, Helô, por estar sempre torcendo e rezando por mim.

Uma palavra de agradecimento para Tatiana Felix, que generosamente leu a versão inicial deste projeto. Os seus comentários ajudaram-me a clarificar.

A querida Tia Ermelinda e sua família maravilhosa que com tanto carinho me acolheram e que sem dúvida sem o seu apoio nada seria possível.

A minha avó Ninfa e meu pai Luiz, já falecidos, minhas saudades, sou grata pelas orações, palavras sábias sobre a vida, as pessoas, por todos os conselhos e amor, meu carinho eterno.

Meus agradecimentos à minha família chegam a ser redundantes, já que ela é o pilar em que sustento toda minha vida. Aos meus pais Luiz e Marilene, por sempre apostarem e terem me proporcionado a maiores das heranças que poderiam ter deixado, a educação e a cultura. A meus irmãos Bruna e Fagner, aos quais devo mais que agradecimentos.

Agradecimentos especiais aos amigos, Mariana, Ariana, Bernardo, André, Etel (ex-chefinha), Gizele, Ana, Rafael, Daniel, C.A, enfim todos do Lab 113, pelo espírito de grupo, apoio mútuo mantido e com quem compartilhei momentos alegres e descontraídos.

À Daniela e Mara minhas grandes amigas, com quem compartilhei minhas alegrias e tristezas e que mesmo longe se mantêm presentes em minha vida.

À Deus, por ter me dado o que tenho de mais precioso, minha vida.

Agradeço em especial as minhas grandes amigas Claudia e Renata, também companheiras nesta jornada, por abraçarem este projeto que só deu certo graças a nossa sólida amizade.

Agradecimentos - Renata

À minha querida mãe, Selma, que sempre esteve ao meu lado nas horas difíceis, me compreendendo e me dando força pra ir adiante.

Ao meu querido pai, Cezar por ter me apoiado nos momentos difíceis e por ter me dado todo o apoio que precisei para chegar até aqui.

Às minhas queridas irmãs Rebeca e Rachel pela amizade, carinho e compreensão para entender a minha ausência em alguns momentos importantes de suas vidas.

Aos meus queridos avós Heloísa, Frederico e Lourdes pelo carinho, ajuda, preocupação e orações. Saibam que nunca deixei de querer passar mais tempo com vocês e de dizer o quanto são importantes para mim.

Ao meu querido padrinho Antonio Marcos pela ajuda, carinho e generosidade.

À minha querida madrinha Glória (Lolô) pela atenção, carinho e alegria.

A Deus por iluminar meu caminho em mais esta etapa de minha vida.

À orientadora Priscilla, pelo seu apoio, seus ensinamentos e sua calma para ajudar a contornar os problemas que tínhamos durante o trabalho.

À professora e orientadora Maria Alice por todo o apoio, dedicação e estímulo dados a este trabalho.

A todo o pessoal do laboratório 113, pela ajuda, contribuição e compreensão.

A todos os amigos que fiz na faculdade, que com certeza contribuíram para que a jornada fosse menos difícil.

Principalmente, às minhas queridas amigas, Claudia e Roberta, pelo companheirismo não só nesta etapa como em todas as outras desta longa jornada que foi o curso de Engenharia Química.

Agradecimentos - Claudia

Agradeço aos meus pais, Nilson e Marlene, por todo apoio e confiança dado ao longo da minha jornada, sem eles nada do que passei teria valido a pena.

Agradeço à minha amiga Roberta, por ter me convidado para estar ao seu lado nesse trabalho, e à minha amiga Renata que teve toda paciência comigo durante nossos trabalhos experimentais. Com elas foi menos difícil superar as dificuldades.

À nossa orientadora Priscilla por todo seu carinho, calma e dedicação na orientação dada durante os experimentos do nosso projeto.

À Professora Maria Alice Zarur Coelho, pela confiança e conhecimento durante a orientação deste trabalho.

Aos amigos do laboratório 113, que dividiram tempo e equipamentos, sempre dispostos a ajudar nos momentos de desespero.

Agradeço a Deus pela superação nos momentos difíceis

Aos meus irmãos e irmã, que mesmo distantes sempre tiveram um papel importante na minha vida.

À minha avó por sua doçura e carinho, por perdoar minha ausência e mesmo assim continuar torcendo por mim.

E finalmente agradeço às minhas amigas Juliana, Sabrina, Milena, Priscila, Roberta e Renata por todos os momentos que passamos juntas. Os estudos, as conversas, as brigas, as festas e acima de tudo a amizade delas que vou guardar sempre comigo.

Índice

RESUMO	X
I INTRODUÇÃO.....	1
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
II.1 Petróleo	2
II.1.1 Poluição provocada pelo petróleo	2
II.2 Biorremediação	5
II.3 <i>Yarrowia lipolytica</i>	6
II.3.1 <i>Yarrowia lipolytica</i> na biodegradação de petróleo.	8
III OBJETIVO.....	10
IV MATERIAIS E MÉTODOS	11
IV.1 Materiais	11
IV.1.1 Petróleo	11
IV.1.2 Meio de cultivo.....	11
IV.2 Microrganismo.....	11
IV.3 Preservação.....	11
IV.4 Cultivos.....	11
IV.4.1 Inóculo.....	11
IV.4.2 Experimentos de biodegradação	12
IV.5 Planejamento experimental	12
IV.6 Metodologias Analíticas.....	14
IV.6.1 Crescimento Celular.....	14
IV.6.2 Concentração de Glicose	14
IV.6.3 Extração do Petróleo.....	15
IV.6.4 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)	16
V RESULTADOS E DISCUSSÕES	17
VI CONCLUSÕES.....	23
VII SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	24
VIII BIBLIOGRAFIA	25

Índice de Figuras

Figura II-1 - Número de vazamentos acima de 7 t.....	3
Figura II-2 - Células de <i>Yarrowia lipolytica</i> observadas no microscópio durante crescimento a 28°C (Felipe, 2006).	7
Figura II-3 - Rota proposta para a degradação de fenol por <i>Yarrowia lipolytica</i> . (Lee et al., 2005).....	9
Figura IV-1- Curva de Peso Seco: Concentração celular x Absorvância.	14
Figura IV-2 - Varredura do espectro de soluções de petróleo em clorofórmio.....	15
Figura V-1 - Microscopia ótica das células de <i>Y. lipolytica</i> (1000X).....	17
Figura V-2 - Gráfico de Pareto.....	19

Índice de Tabelas

Tabela II-1- Maiores Derramamentos de Óleo Ocorridos no Mar.....	4
Tabela IV-1 - Composição do meio utilizado nos experimentos de biodegradação.	12
Tabela IV-2- Fatores e níveis analisados no planejamento experimental 2 ⁴	13
Tabela IV-3- Matriz de planejamento fatorial 2 ⁴ para o estudo da influência das variáveis na biodegradação de óleo cru.	13
Tabela V-1 - Influência da centrifugação do inóculo.....	17
Tabela V-2- Resultado do planejamento experimental fatorial.	18
Tabela V-3 - Crescimento celular em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após 120 horas de experimento.	20
Tabela V-4 - Remoção (%) de petróleo nas condições escolhidas.	22

RESUMO

No presente trabalho avaliou-se a degradação de óleo cru por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Esta cepa apresenta alta hidrofobicidade em sua superfície, o que facilita o contato com o óleo além de produzir agentes bioemulsionantes.

Para isso, foram estudadas as seguintes variáveis: a concentração inicial de células e petróleo, a velocidade de agitação do sistema e a presença de glicose.

Foi possível observar que as células crescem mais rapidamente quando a agitação do sistema é maior, na presença de uma maior concentração celular inicial. *Y. lipolytica* é uma levedura estritamente aeróbia e seu crescimento e produção de metabólitos são influenciados pela disponibilidade de oxigênio.

Na presença de alta concentração de petróleo, uma maior concentração inicial de glicose é necessária para se obter maior conversão em células. A glicose é consumida nas horas iniciais do ensaio e, sendo uma fonte de carbono facilmente assimilável, esta é rapidamente consumida, produzindo uma maior concentração de células que estarão disponíveis para biodegradar o petróleo. Quando a concentração inicial de células é maior, a presença de glicose torna-se desnecessária, fato que possivelmente indica que a assimilação dos compostos presentes no óleo cru esteja não-associada ao crescimento celular, mas relacionada apenas com a concentração celular presente no sistema.

I INTRODUÇÃO

O derramamento de petróleo é um grande perigo para os ecossistemas terrestres e marinhos. A quantidade total de óleo derramado no mar é estimado em, aproximadamente, 5,2 milhões de toneladas e, em áreas produtoras, este é quase inevitável (Leahy & Colwell, 1990). Portanto, novas tecnologias para remediar esses ambientes poluídos são extremamente necessárias e urgentes.

Pesquisas desenvolvidas mostraram que diversos grupos de bactérias e fungos têm habilidade para degradar os componentes de petróleo. As bactérias, responsáveis pela degradação do óleo estão presentes no mar e tendem a ser mais abundante em áreas muito poluídas. Após um derramamento de óleo, essas bactérias encontram nos componentes do óleo uma fonte de carbono, iniciando o processo chamado de biodegradação (Ferrão, 2005).

Os microrganismos naturalmente presentes em locais contaminados têm maior resistência e já iniciam a degradação do poluente. A adição de microrganismos exógenos nesses locais pode aumentar a remoção dos contaminantes (Aldrett et al., 1997). O crescimento celular na presença de hidrocarbonetos é frequentemente acompanhado pela emulsificação da fonte insolúvel de carbono na fase aquosa (Reddy et al., 1982). Em alguns casos, isto é devido à indução da síntese de agentes emulsionantes extracelulares destinados à hidrólise dos hidrocarbonetos (Ilori et al., 2005).

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbia e possui habilidade de degradar eficientemente substâncias hidrofóbicas tais como n-alcanos, ácidos graxos, gorduras e óleos utilizando caminhos metabólicos específicos (Fickers et al., 2005). Zinjarde & Pant (2002) analisaram seis diferentes espécies de leveduras na degradação de óleo cru e concluíram que *Yarrowia lipolytica* foi a espécie mais eficiente, utilizando 78% da fração alifática do óleo cru.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ, isolada da Baía de Guanabara (RJ), na biodegradação do óleo cru. Esta cepa apresenta alta hidrofobicidade em sua superfície (Amaral et al., 2006a) o que facilita o contato com o óleo além de produzir agentes bioemulsionantes (Amaral et al., 2006b).

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 Petróleo

O petróleo é uma substância considerada a principal fonte de energia, não renovável, de origem fóssil. Este composto possui em sua composição cadeias de hidrocarbonetos, cujas frações leves formam os gases e as frações pesadas o óleo cru. A distribuição desses percentuais de hidrocarbonetos é que define os diversos tipos de petróleo existentes no mundo (<http://www.ambientebrasil.com.br>).

O petróleo e o gás natural são encontrados tanto em terra quanto no mar, principalmente nas bacias sedimentares, onde se encontram reservatórios em meios mais porosos, mas também em rochas do embasamento cristalino. Os hidrocarbonetos, portanto, ocupam espaços porosos nas rochas, sejam entre grãos ou fraturas (<http://www.ambientebrasil.com.br>).

Sua aplicação começou há aproximadamente 3000 anos, inicialmente para usos diversos tais como reparos em barcos, nas construções de casas e palácios e até mesmo para curar doenças de pele. Mais tarde, em meados do século XIX, passou a ser usado na iluminação e, posteriormente, com o uso em máquinas de combustão interna e o crescimento do transporte motorizado levou ao aumento rápido da demanda (<http://www.ambientebrasil.com.br>).

Ao longo do tempo, o petróleo, foi se impondo como fonte de energia eficaz. Hoje, além de grande utilização dos seus derivados pela indústria petroquímica, centenas de novos produtos foram surgindo, muitos deles diariamente utilizados, como os plásticos, borrachas sintéticas, tintas, corantes, adesivos, solventes, detergentes, explosivos, produtos farmacêuticos, cosméticos, etc. Com isso, o petróleo além de produzir combustível e energia, passou a ser imprescindível para a utilidade e comodidades da vida moderna (<http://www.ambientebrasil.com.br>).

II.1.1 Poluição provocada pelo petróleo

Explorado comercialmente desde meados do século XIX, o petróleo foi usado, por muitas décadas, para a iluminação e, em menor escala, como lubrificante. A invenção do motor de combustão interna e sua adoção rápida em todas as formas de transporte ampliaram o emprego desse recurso natural, aumentando a demanda e, conseqüentemente, a produção, o transporte, a estocagem e a distribuição tanto do óleo cru quanto de seus derivados. Todas essas atividades envolvem riscos de derrames acidentais, que podem ser minimizados, mas não totalmente eliminados (Ferrão, 2005).

O mais importante método de transporte de petróleo ocorre por navios e por oleodutos sobre a terra. Tais métodos de transporte podem poluir o ambiente através de acidentais derramamentos de petróleo por operações de descarga,

como por exemplo, a limpeza dos tanques de estocagem. Porém, a dispersão do óleo derramado em terra é mais restrita do que em água. Danos em terra são causados à vegetação e aos animais, mas com a grande capacidade de absorção da terra e a formação de blocos pelo óleo derramado, esse não se distribui enormemente. Esta é a grande diferença entre os ambientes aquáticos e terrestres (Ferrão, 2005).

Atualmente existem mais de 3.500 petroleiros em operação. Neste valor estão incluídos os maiores navios do mundo, que podem carregar mais de meio milhão de toneladas de óleo cru (Ferrão, 2005). A Figura II-1 mostra, segundo os dados da *ITOPF (International Tanker Owners Pollution Federation)*, os vazamentos de petróleo caracterizados por quantidade (entre 7 e 700 toneladas e superior a 700 toneladas) ao longo dos últimos anos. A Figura II-1 comprova que o número de grandes vazamentos (> 700 t) tem diminuído nos últimos trinta anos e que a maioria dos acidentes é de médio ou de pequeno porte.

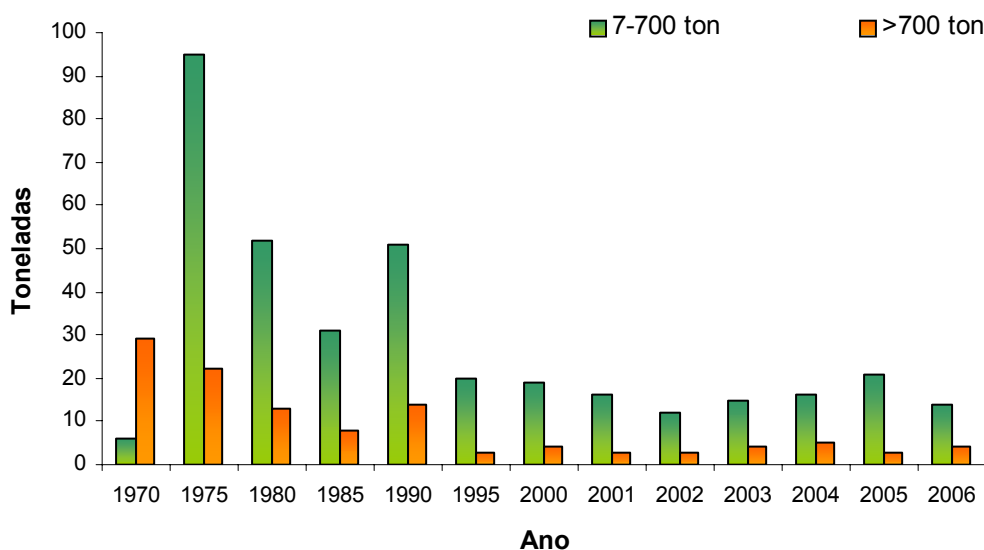


Figura II-1 - Número de vazamentos acima de 7 t.

Fonte: Modificado de Ferrão (2005)

Na Tabela II.1, encontram-se listados, os 20 maiores vazamentos de óleo desde 1967.

Tabela II-1- Maiores Derramamentos de Óleo Ocorridos no Mar

Posição	Navio	Ano	Localização	Tamanho do vazamento (ton)
1	<i>Atlantic Empress</i>	1979	Tobago, West Indies	287
2	<i>ABT Summer</i>	1991	700 milhas náuticas de Angola	260
3	<i>Castillo de Bellver</i>	1983	Saldanha Bay, Africa do Sul	252
4	<i>Amoco Cadiz</i>	1978	Brittany, França	223
5	<i>Haven</i>	1991	Genoa, Itália	144
6	<i>Odyssey</i>	1988	700 milhas náuticas da Nova Scotia, Canadá	132
7	<i>Torrey Canyon</i>	1967	Scilly Isles, UK	119
8	<i>Sea Star</i>	1972	Golfo de Oman	115
9	<i>Irenes Serenade</i>	1980	Navarino Bay, Grécia	100
10	<i>Urquiola</i>	1976	La Coruna, Espanha	100
11	<i>Hawaiian Patriot</i>	1977	300 milhas náuticas de Honolulu	95
12	<i>Independenta</i>	1979	Bosphorus, Turquia	95
13	<i>Jakob Maersk</i>	1975	Oporto, Portugal	88
14	<i>Braer</i>	1993	Shetland Islands, UK	85
15	<i>Khark 5</i>	1989	120 milhas náuticas da Costa Atlântica de Morocco	80
16	<i>Aegean Sea</i>	1992	La Coruña, Espanha	74
17	<i>Sea Empress</i>	1996	Milford Haven, UK	72
18	<i>Katina P</i>	1992	Maputo, Moçambique	72
19	<i>Nova</i>	1985	Kharg Island, Golfo do Irã	70
20	<i>Prestige</i>	2002	Costa Espanhola	63

Fonte: Modificado de Ferrão (2005)

Ao longo dos anos, esses acidentes mostraram como o petróleo é prejudicial ao ambiente marinho, mas também serviram para o desenvolvimento de técnicas para remediar os derrames acidentais. Essas técnicas incluem em geral métodos físicos e químicos, como barreiras de contenção, aparelhos de sucção, uso de jato d'água, adsorventes, formadores de gel, precipitantes e dispersantes químicos (<http://cienciahoje.uol.com.br>).

Em 1946, o microbiólogo marinho norte-americano Claude E. ZoBell (1905-1989) identificou, pela primeira vez, microrganismos capazes de consumir petróleo, isto é, de usá-lo como fonte de carbono para a produção de biomassa. Porém, somente 21 anos depois, em 1967, devido ao acidente com o superpetroleiro *Torrey Canyon*, na Inglaterra, e o desenvolvimento da exploração de petróleo no Ártico houve um alerta para o risco de outros acidentes. (<http://cienciahoje.uol.com.br>).

A partir desse momento, os pesquisadores passaram a se preocupar em conhecer o destino do petróleo como poluente e dar atenção especial ao ambiente marinho, começando assim a se utilizar a biorremediação como alternativa para os tratamentos desses ambientes contaminados (<http://cienciahoje.uol.com.br>).

II.2 Biorremediação

Trata-se de um processo ou estratégia que busca destoxificar o solo ou outros ambientes contaminados fazendo uso de microrganismos (fungos, bactérias, etc) e/ou de enzimas. Baseia-se no processo de degradação microbiana a fim de que os contaminantes sejam transformados em compostos que não ofereçam riscos ao ambiente e às populações que ali habitam (<http://www.ambientebrasil.com.br>).

Três aspectos devem ser considerados nos processos de biorremediação:

- A existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante.
- O contaminante tem que estar disponível ou acessível ao ataque microbiano ou enzimático.
- Condições ambientais adequadas para o crescimento e a atividade do agente biorremediador.

Como todo ser vivo, os microrganismos necessitam de energia e nutrientes para sua sobrevivência (fonte de nitrogênio, fósforo, carbono e outros minerais). De uma forma geral, a fonte de carbono garante energia para que o microrganismo cresça. Em função da quantidade de contaminante (substrato) exposto no meio, haverá ou não um aumento de microrganismos. Geralmente, quanto mais substrato, maior o número e talvez a diversidade de microrganismos presentes. À medida que o contaminante é degradado, a população microbiana vai alcançando o nível de estabilidade (<http://www.ambientebrasil.com.br>).

A degradação dá-se produzindo compostos menos complexos e mais biodegradáveis, reduzindo a toxicidade e a migração de contaminantes perigosos no material em tratamento (biotransformação). A biorremediação tem como vantagens (Apontamentos da disciplina EQB-049 - Biotecnologia Ambiental, UFRJ, 2005):

- Baixo custo, pois utiliza sistemas biológicos cujo custo é reduzido;
- Utiliza tecnologias seguras, econômicas e mais rápidas que alguns tratamentos físico-químicos;
- Implementada em campo (*in situ*) tem vantagens adicionais, pois se eliminam custos de transporte já que o tratamento é feito no próprio local. Ao utilizar uma população microbiana nativa, elimina-se a necessidade de se introduzirem microrganismos potencialmente perigosos;
- Pode ser considerada uma forma de controle, de prevenção e redução de toxicidade de contaminantes em águas subterrâneas e solos;
- Reduz a necessidade de processos de tratamento de elevado custo e de longo prazo;
- Quando os contaminantes orgânicos são utilizados como principal fonte de carbono e energia pelos microrganismos, o processo realiza-se com maior rapidez.

Portanto, o estudo de novas espécies microbianas para este fim é de interesse incontestável.

II.3 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um microrganismo estritamente aeróbio capaz de produzir metabólitos importantes entre os quais se encontram ácidos orgânicos, lisina, proteases extracelulares ácidas e alcalinas, lipases, esterases, fosfatases e RNAses, e possui uma atividade secretória bastante intensa. Atualmente, vem sendo utilizada como um modelo para o estudo de secreção de proteínas, biogênese de peroxissomas, dimorfismo, degradação de substratos hidrofóbicos (SH) e muitos outros campos novos de estudo (Fickers *et al.*, 2005). Devido a esses fatos os esforços para se utilizar essa levedura na indústria como biocatalisador, em biologia molecular e em estudos genéticos são justificados, sendo esta utilizada em aplicações industriais como a produção de proteínas celulares, aroma de pêssego, ácido cítrico, biossurfactantes e em processos de biorremediação (Nicaud *et al.*, 2002).

Yarrowia lipolytica é uma levedura pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos que era anteriormente conhecida como *Candida lipolytica* (Fig. II-2). É uma levedura dimórfica natural, que forma células leveduriformes, pseudohifas e hifas septadas. Não é considerada patogênica, pois a maioria das cepas é incapaz de crescer acima de 32°C. Pode ser encontrada em lugares variados, tais como laticínios, solo, esgoto e em ambientes contaminados com óleo (Barth e Gaillardin, 1997, Hagler e Mendonça-Hagler, 1981).



Figura II-2 - Células de *Yarrowia lipolytica* observadas no microscópio durante crescimento a 28°C (Felipe, 2006).

Acredita-se que o dimorfismo apresentado por *Yarrowia lipolytica*, assim como por outras espécies, constitua um mecanismo de resposta a condições adversas, tendo sido atribuída a mudanças na temperatura e condições nutricionais. Em cepas selvagens, a habilidade de formar hifas pode ser uma vantagem seletiva, sendo uma saída para a escassez de nutrientes. Além disso, a capacidade de formação de pseudo-hifas em resposta a condições de estresse permite a proteção contra um ambiente prejudicial (Felipe, 2006).

Yarrowia lipolytica não requer limitação de nitrogênio para a indução da esporulação, em contraste com *Saccharomyces cerevisiae* e outras espécies. Cepas diplóides esporulam em meios complexos sólidos ou líquidos com depleção de glicose (Barth e Gaillardin, 1997).

As células de *Yarrowia lipolytica* utilizam prontamente hexoses, ácidos orgânicos, etanol, glicerol e SH (Substrato Hidrofóbico) como fontes únicas de carbono e energia, mas não utilizam sacarose, pois não apresentam atividade invertásica. Alcenos polimetilados ou clorados, e 1-alcenos também são assimilados por esse microrganismo (Barth & Gaillardin, 1997).

Na maioria das leveduras não-convencionais, como *Yarrowia lipolytica*, em contraste com *Saccharomyces cerevisiae*, a respiração em presença de oxigênio é essencial para o uso de açúcares. As membranas celulares não são totalmente permeáveis para um conjunto de solutos, entre eles os açúcares. O transporte desses solutos é a etapa inicial do metabolismo de carboidrato e dá-se através de transportadores específicos, conhecidos como permeases. Em *Yarrowia lipolytica* existe um sistema de transporte de glicose com dois componentes, que apresentam a mesma atividade independentemente da concentração desse composto no meio (Pereira - Meirelles *et al.*, 1997).

Uma característica importante da assimilação de alcanos por leveduras é o fluxo metabólico de carbono a partir do substrato para a síntese de todos os componentes celulares via ácidos graxos, que é bastante diferente do caso de substratos convencionais, como carboidratos (Fickers *et al.*, 2005).

II.3.1 *Yarrowia lipolytica* na biodegradação de petróleo.

Estudos realizados utilizando espécies de *Yarrowia* na biodegradação de hidrocarbonetos obtiveram resultados satisfatórios. Komagata *et al.* (1964) examinaram a habilidade de cerca de 500 leveduras em degradar hidrocarbonetos e perceberam que 56 foram capazes de utilizar esses hidrocarbonetos, quase todas pertencentes ao gênero *Candida*.

Ijah (1998) isolou duas bactérias (*Serratia marcescens* e *Acinetobacter calcoaceticus*) de solo contaminado com óleo e uma levedura (*Candida tropicalis*) de solo não contaminado e estudou a capacidade de degradação de óleo cru. *Candida tropicalis* apresentou maior eficiência na remoção do óleo cru, sendo capaz de degradar 69% do óleo em 16 dias.

Kim *et al.* (1999) isolaram uma espécie de levedura de uma área industrial poluída com óleo e verificaram que esta levedura apresentava alta capacidade de degradação de hidrocarbonetos alifáticos. Analisando o conteúdo genético de tal microrganismo puderam verificar que se tratava de *Yarrowia lipolytica*, sendo este microrganismo capaz de degradar 94% dos hidrocarbonetos alifáticos em 3 dias a 25°C.

Zinjarde e Pant (2002) isolaram leveduras de amostras marinhas tropicais. A cepa que apresentou melhor desempenho foi da espécie *Yarrowia lipolytica*, sendo capaz de degradar 78% da fração alifática de óleo cru a 30°C em 5 dias.

Essa habilidade em degradar frações do petróleo pode estar vinculada à possível capacidade de clivagem do anel aromático como proposto por Lee *et al.* (2000), que demonstraram que uma cepa de *Yarrowia lipolytica* foi capaz de degradar compostos aromáticos como fenol e 4-clorofenol propondo uma rota para essa biodegradação (Figura II-3).

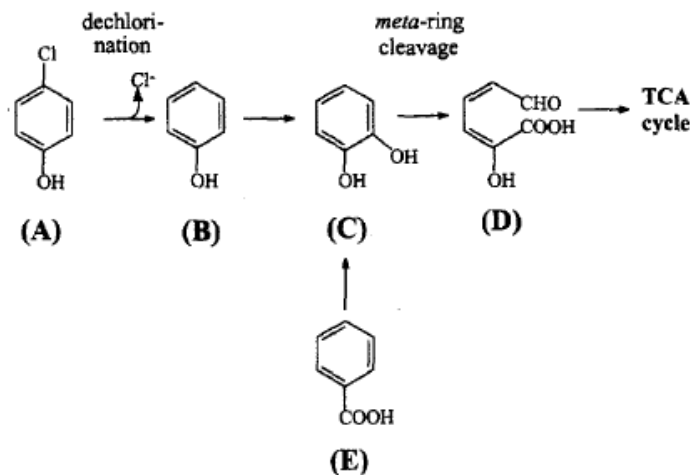


Figura II-3 - Rota proposta para a degradação de fenol por *Yarrowia lipolytica*. (Lee et al., 2005)

III OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a biodegradação do óleo cru (petróleo Marlin) utilizando uma cepa de *Yarrowia lipolytica* isolada da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro – RJ (Brasil). Teve como etapas principais:

- Avaliar a influência da agitação do sistema no crescimento celular em óleo cru;
- Avaliar os efeitos da presença de glicose na biodegradabilidade do óleo cru;
- Verificar o potencial de biodegradação da cepa em diferentes concentrações de óleo cru.

IV MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 Materiais

IV.1.1 Petróleo

O óleo cru empregado neste trabalho foi o Petróleo Marlin gentilmente cedido pela Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS), tendo como principais características: 18,93 °API (petróleo pesado); peso molecular \approx 3000; asfaltenos = 3,1%; relação resinas / asfaltenos = 8,1; relação saturados / aromáticos = 1,6; 2,66% de N, S e O.

IV.1.2 Meio de cultivo

Os componentes dos meios de cultivo e de manutenção foram fornecidos pelas seguintes empresas: Merck (Peptona), Oxoid (Extrato de lêvedo), Isofar (Glicose) e Vetec (Agar).

IV.2 Microrganismo

Utilizou-se no presente trabalho uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (Haegler e Mendonça-Haegler, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

IV.3 Preservação

As células foram conservadas a 4°C após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio YPD (“Yeast Extract, Peptone, Dextrose”) contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e agar-agar 2%.

IV.4 Cultivos

IV.4.1 Inóculo

A partir dos tubos contendo as células preservadas em gelose inclinada, estas foram transferidas, de forma estéril, com uma alça de platina para erlenmeyers de 500 mL. Estes frascos continham 200 mL de meio de cultivo YPD (2% glicose; 2% peptona; 1% extrato de lêvedo, p/v). Após cerca de 32 horas em um incubador rotatório a 29°C e 160 rpm, as células eram centrifugadas de forma

estéril a 3000 g por 10 minutos e ressuspensas em meio mineral. O volume centrifugado deste pré-inóculo era suficiente para se obter a concentração inicial de células desejada no meio mineral.

IV.4.2 Experimentos de biodegradação

Para os experimentos de biodegradação foi utilizado o meio de cultivo apresentado na Tabela IV-1. O meio mineral foi utilizado para a realização dos ensaios de biodegradação do óleo cru. Portanto, o petróleo Marlin foi adicionado a este meio após esterilização em autoclave (0,5 atm por 15 min).

Tabela IV-1 - Composição do meio utilizado nos experimentos de biodegradação.

Meio mineral	
Composto	Concentração (%p/v)
NaCl	0,35
K ₂ HPO ₄	0,07
KNO ₃	0,21
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,01
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,002

Fonte: Felipe (2006)

Após a inoculação das células previamente crescidas em erlenmeyer contendo meio de crescimento a 28°C e 160 rpm, estes foram incubados em erlenmeyer de 250 ml e 100 ml de meio mineral sob temperatura de 28°C durante 5 dias e agitação (70 ou 160 rpm), variando também a concentração celular inicial e a concentração de petróleo no meio, de acordo com o planejamento experimental apresentado no item IV.5.

IV.5 Planejamento experimental

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar o resultado dessa variação. Isso implica na realização de ensaios em pelo menos dois níveis desse fator. Havendo K fatores, isto é, K variáveis controladas, o planejamento de dois níveis irá requerer a realização de 2^K ensaios diferentes (NETO *et al.*, 1995). Portanto, utilizou-se um planejamento experimental fatorial 2⁴, com 16 experimentos, considerando 4 variáveis: agitação e concentrações de células, petróleo e glicose.

A Tabela IV-2 mostra os níveis de cada variável estudada e a Tabela IV-3 apresenta a matriz dos experimentos realizados. Nos planejamentos de dois níveis costuma-se identificar os níveis inferior e superior com os sinais (-1) e (+1), respectivamente. A atribuição desses sinais é uma escolha arbitrária. No entanto, é natural atribuir o nível superior aos valores mais altos.

Tabela IV-2- Fatores e níveis analisados no planejamento experimental 2⁴.

Variáveis	Níveis	
	-1	1
Agitação (rpm)	70	160
[Células] (mg/ml)	0,1	1
Petróleo % (v/v)	0,1	1
[Glicose] (g/L)	0	1

Tabela IV-3- Matriz de planejamento fatorial 2⁴ para o estudo da influência das variáveis na biodegradação de óleo cru.

Frasco	Agitação (rpm)	[Células] (mg/ml)	Petróleo % (v/v)	[Glicose] (g/L)
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1

IV.6 Metodologias Analíticas

IV.6.1 Crescimento Celular

Alíquotas de 2 mL da fase aquosa (meio mineral) foram retiradas ao longo do experimento para a quantificação do crescimento celular através da leitura de absorvância a 570 nm em espectrofotômetro DR4000 (HACH) e posteriormente correlacionadas com o peso seco de células através de um fator de conversão pré-determinado, de acordo com a Figura IV-1. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

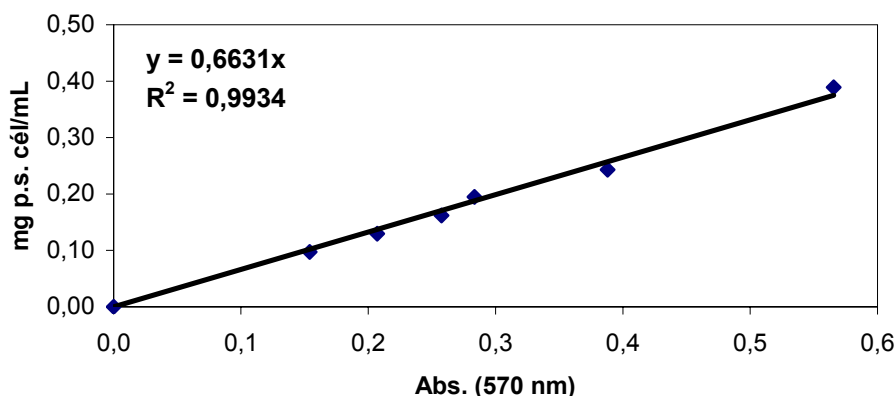


Figura IV-1- Curva de Peso Seco: Concentração celular x Absorvância.

IV.6.2 Concentração de Glicose

A glicose do meio de cultivo foi medida pelo método da glicose oxidase (kit enzimático, Merck).

Neste método, a leitura é feita em espectrofotômetro a 500 nm, em temperatura ambiente, contra o branco de reação, que é composto pelo reagente enzimático e água.

Tomaram-se alíquotas de 15 μL de amostra e completou-se o volume com 1500 μL de Reagente Enzimático. Após a homogeneização, incubou-se por 10min a 37°C. A absorvância da amostra e do padrão foram medidas contra o branco de reação em no máximo 60 minutos. O padrão de glicose pertencente ao kit enzimático possui uma concentração de 100 mg.dL^{-1} e o Reagente Enzimático contém: tampão fosfato (pH 7,5) 100 mmol.L^{-1} ; 4-aminofenazona 0,25 mmol.L^{-1} ; Fenol 0,75 mmol.L^{-1} ; glicose oxidase 15000 U.L^{-1} ; Peroxidase 1500 U.L^{-1} ; Mutarotase 2000 U.L^{-1} .

O cálculo de concentração de glicose foi realizado através da Equação (III.1):

$$C = 100 * \left(\frac{A_a}{A_p} \right) \quad (\text{III.1})$$

onde:

A_a = Absorvância da amostra

A_p = Absorvância do padrão

C = concentração de glicose na amostra (mg.dL⁻¹)

VI.6.3 Extração do Petróleo

Para analisar a degradação do petróleo ao final dos ensaios, todo o volume do frasco (100 ml) foi transferido para um funil de separação, no qual se adicionou o mesmo volume de clorofórmio (100 ml) para a extração da fase orgânica (petróleo). O tempo de extração foi de três minutos e em seguida realizou-se a varredura em comprimentos de onda desde 190 a 800 nm, usando-se como linha base, o clorofórmio.

Para verificar se haveria uma correlação entre absorvância e concentração de óleo cru foi preparada uma solução de petróleo em clorofórmio na concentração de 9,55 g/L foi preparada e diferentes diluições foram realizadas, obtendo-se soluções com concentrações de (em g/L): 0,19 e 0,10. Para cada solução fez-se uma varredura de comprimento de onda de 190 a 800 nm em espectrofotômetro DR4000UV (HACH), como mostra a Figura IV-2.

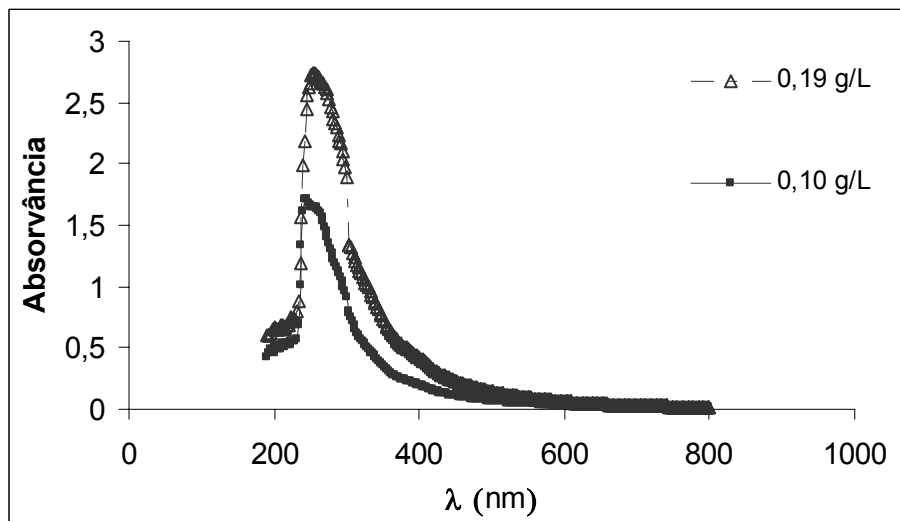


Figura IV-2 - Varredura do espectro de soluções de petróleo em clorofórmio.

IV.6.4 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

O modo usual de realizar uma contagem de células viáveis (célula capaz de se multiplicar e dar origem a uma célula-filha) consiste em determinar o número de células capazes de formar colônias em um meio de cultura sólido com composição adequada ao crescimento do microrganismo. Assume-se que cada colônia é originada a partir de uma única célula viável, o que nem sempre é verdade, pois duas ou mais células que formem um agregado, darão origem a uma única colônia. Por isso, os resultados são normalmente expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) e o método é vulgarmente designado por contagem de UFCs (<http://www.e-escola.pt>).

Após diluição conveniente da suspensão celular em solução salina (0,9% (p/v) de NaCl) estéril, espalhou-se um volume conhecido (0,1 ml) de cada suspensão diluída sobre meio de cultura YPD sólido depositado em placa de Petri para a multiplicação celular da levedura. Pretende-se que as células fiquem distanciadas de modo que, após várias divisões celulares, originem colônias visíveis a olho nu, o que se verificou após 48 horas de incubação em temperatura de 28°C. O grau de diluição da suspensão celular foi escolhido de modo a que o número de colônias isoladas em cada placa não fosse inferior a 20 ou superior a 300 colônias (<http://www.e-escola.pt>).

V RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para verificar o potencial de degradação de óleo cru por *Yarrowia lipolytica*, foram estudadas as seguintes variáveis: a concentração inicial de células (0,1 e 1,0 mg/ml), a concentração inicial de petróleo (0,1 e 1,0% (v/v)), a velocidade de agitação do sistema (70 e 160 rpm) e a presença de glicose (0 e 1,0 g/L).

Para os experimentos preliminares analisou-se o potencial de degradação em termos de produção de biomassa na fase aquosa. Foi observada uma pequena redução na concentração de células no início dos experimentos. Tal fato foi investigado através de observações microscópicas de amostras do meio de cultivo. Detectou-se a adesão de células ao óleo cru, como pode ser observado na Figura V-1. Esse fenômeno ocorre devido a característica hidrofóbica da superfície celular dessa cepa de *Y. lipolytica*, como descrito por Amaral *et al.* (2006). Portanto, as medidas de concentração celular na fase aquosa são subestimadas.

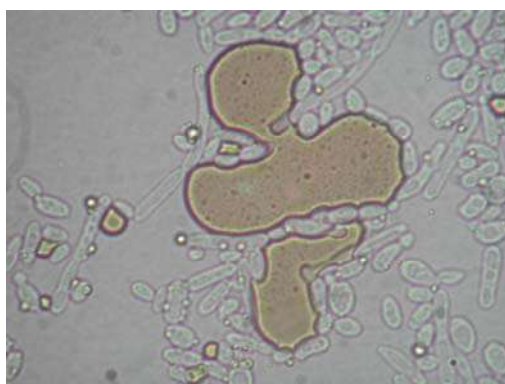


Figura V-1 - Microscopia ótica das células de *Y. lipolytica* (1000X).

Para garantir que o crescimento celular seria devido somente à fonte de carbono fornecida para o experimento (glicose ou óleo cru) realizaram-se testes nas mesmas condições de biodegradação com inóculo centrifugado e não centrifugado. Comparando os resultados obtidos, Tabela V.1, verificou-se que cerca de 58% do crescimento celular poderia ocorrer devido à presença de resíduos do meio de pré-cultivo (YPD) levados para o meio mineral.

Tabela V-1 - Influência da centrifugação do inóculo.

Agitação (rpm)	[Células] (mg/mL)	Petróleo %(v/v)	[Glicose] (mg/mL)	Centrifugação do inóculo	$\Delta X_{m\acute{a}x}$
160	0,1	0,1	0	SIM	0,029
				NÃO	0,069

Adotou-se então para os ensaios de biodegradação, uma etapa de centrifugação estéril do inóculo e de lavagem das células com o meio mineral.

A Tabela V-2 apresenta o planejamento experimental com as variáveis-resposta: variação máxima da concentração celular ($\Delta X_{\text{máx}}$) e taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$). As expressões para o cálculo dessas variáveis foram: $\Delta X_{\text{máx}} = (X_{\text{máx}} - X_{\text{inicial}})$ e $\mu_{\text{máx}} = (\ln (X_f / X_i)) / (T_f - T_i)$.

Tabela V-2- Resultado do planejamento experimental fatorial.

Experimento	Agitação (rpm)	[Células] (mg/mL)	Petróleo % (v/v)	[Glicose] (mg/mL)	$\Delta X_{\text{máx}}$ (mg células/mL)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)
1	70	0,1	0,1	0	0,03	0,08
2	70	0,1	0,1	1	0,31	0,09
3	70	0,1	1	0	0,07	0,14
4	70	0,1	1	1	0,23	0,07
5	70	1	0,1	0	0,33	0,03
6	70	1	0,1	1	0,42	0,06
7	70	1	1	0	0,29	0,05
8	70	1	1	1	0,52	0,06
9	160	0,1	0,1	0	0,03	0,03
10	160	0,1	0,1	1	0,28	0,06
11	160	0,1	1	0	0,02	0,03
12	160	0,1	1	1	0,33	0,06
13	160	1	0,1	0	1,25	0,56
14	160	1	0,1	1	1,00	0,35
15	160	1	1	0	0,75	0,22
16	160	1	1	1	1,15	0,47

Utilizando-se o *software* STATISTICA (versão 6) foi possível detectar as variáveis estatisticamente significativas, como pode ser observado no gráfico de Pareto, apresentado na Figura V-2, que pode ser utilizado para identificar de forma rápida e clara os efeitos que são importantes. A resposta analisada foi a variação máxima de concentração celular ($\Delta X_{\text{máx}}$).

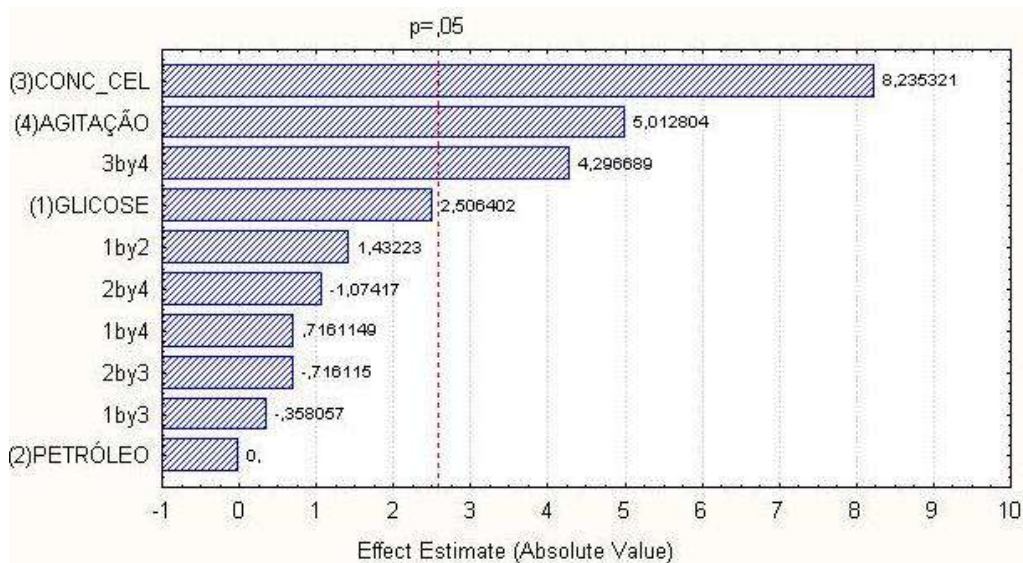


Figura V-2 - Gráfico de Pareto

Pode-se observar que a variável que mais influencia a resposta ($\Delta X_{m\acute{a}x}$) é a concentração inicial de células, seguida pela agitação do sistema e a interação destes dois parâmetros, cujos retângulos estão à direita da linha divisória ($p < 0,05$).

É possível observar que as células crescem mais rapidamente quando a agitação do sistema é maior, na presença de uma maior concentração celular inicial. *Y. lipolytica* é uma levedura estritamente aeróbia sendo seu crescimento e produção de metabólitos influenciados pela disponibilidade de oxigênio (Alonso et al., 2005; Amaral et al., 2006). Portanto, a maior agitação permitiu uma maior oxigenação do sistema e um maior contato das células com o óleo cru, fornecendo um maior rendimento em biomassa.

A concentração inicial de petróleo ou de glicose são as variáveis que menos influenciam o crescimento celular, o que pode ser observado na Figura V-2. Na presença de alta concentração de petróleo, uma maior concentração inicial de glicose é necessária para obter maior conversão em células.

A glicose é degradada nas horas iniciais do ensaio como observado na Figura V-3, sendo uma fonte de carbono facilmente assimilável, essa é rapidamente consumida produzindo uma concentração maior de células disponível para biodegradar o petróleo. Quando a concentração inicial de células é maior, a presença de glicose torna-se desnecessária (Tabela V-2), fato que possivelmente indica que a assimilação dos compostos presentes no óleo cru não esteja associada ao crescimento celular, mas relacionada apenas com a concentração celular presente no sistema.

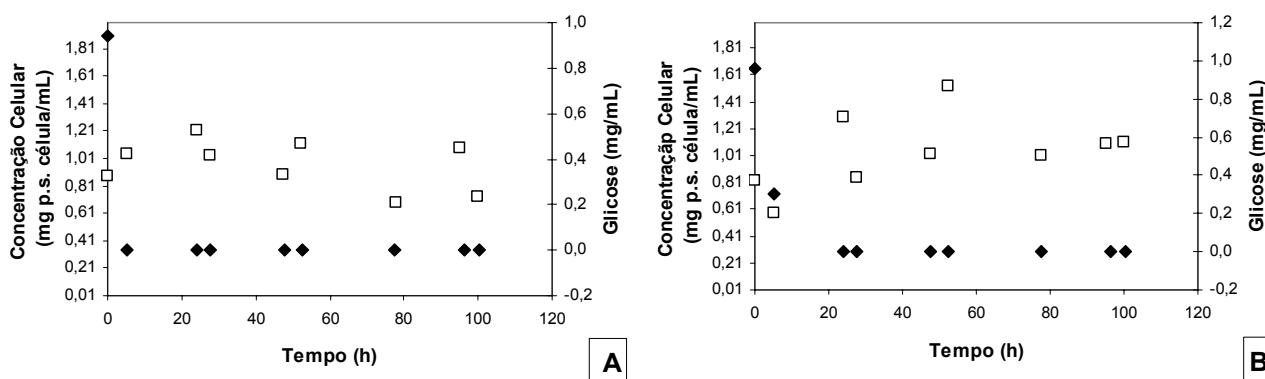


Figura V-3 - Perfis de Crescimento celular (□) e Concentração de glicose (◆) a 160 rpm e concentração inicial de células de 1,0 mg/mL para as diferentes concentração inicial de Petróleo: (A) 0,1% (v/v); (B) 1,0% (v/v).

Porém, é possível observar que o microrganismo apresenta algum crescimento após o esgotamento da glicose. Considerando que os valores de crescimento medidos na fase aquosa estejam subestimados, uma parcela do óleo cru assimilado é destinado ao crescimento celular (Figura V-3).

Através destes resultados foi possível escolher as condições mais significativas para a degradação do óleo cru, na presença e ausência de glicose: agitação de 160 rpm e concentração inicial de células de 1,0 mg/mL. Essas condições foram empregadas nos experimentos onde se quantificou o crescimento celular por plaqueamento (em Unidades Formadoras de Colônias). A Tabela V-3 apresenta os resultados obtidos para esses ensaios.

Tabela V-3 - Crescimento celular em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após 120 horas de experimento.

Condições		UFC / ml	
Glicose (mg/mL)	Petróleo (% v/v)	Inicial ($\times 10^{-11}$)	Final ($\times 10^{-14}$)
0	0,1		1,32
1,0	0,1		0,57
0	1,0	2,32	8,50
1,0	1,0		0,95
1,0	0		1,48

A Tabela V-3 demonstra que o óleo cru é utilizado como fonte de carbono para crescimento celular (experimentos sem glicose). Por outro lado, a presença dessa fase orgânica parece ter algum efeito inibitório no crescimento quando na presença de glicose

uma vez que os níveis de crescimento alcançados na presença de glicose, com e sem petróleo não são similares. Este fato indica que a célula necessita de um período significativo de adaptação para alternar entre o consumo da fonte de carbono facilmente assimilável (glicose) e a utilização do óleo cru. Adicionalmente, em experimento contendo apenas glicose como fonte de carbono (na concentração de 1 mg/mL) o crescimento celular alcançou níveis similares ($1,48 \times 10^{-14}$ UFC / ml) aos encontrados nos experimentos com glicose e 1,0 % (v/v) de óleo cru ($0,95 \times 10^{-14}$ UFC/ml), demonstrando que no tempo avaliado as células estariam consumindo preferencialmente a glicose.

Apesar dos erros experimentais associados à contagem do número de UFCs, este método fornece uma informação muito importante sobre o número de células viáveis numa população. O método tem a virtude de ser bastante sensível, permitindo que suspensões celulares contendo poucas células possam ser quantificadas.

Nas condições selecionadas para crescimento celular realizou-se a extração da fase orgânica. Além disso, foram realizados experimentos na ausência de células para se quantificar a perda de petróleo por evaporação o qual chamamos de controle.

A Figura V-4 apresenta a varredura de comprimento de onda das extrações com clorofórmio do óleo cru remanescente nos frascos após 120 horas da biodegradação por *Y. lipolytica* nas condições ótimas e também do controle, ou seja, na ausência de células.

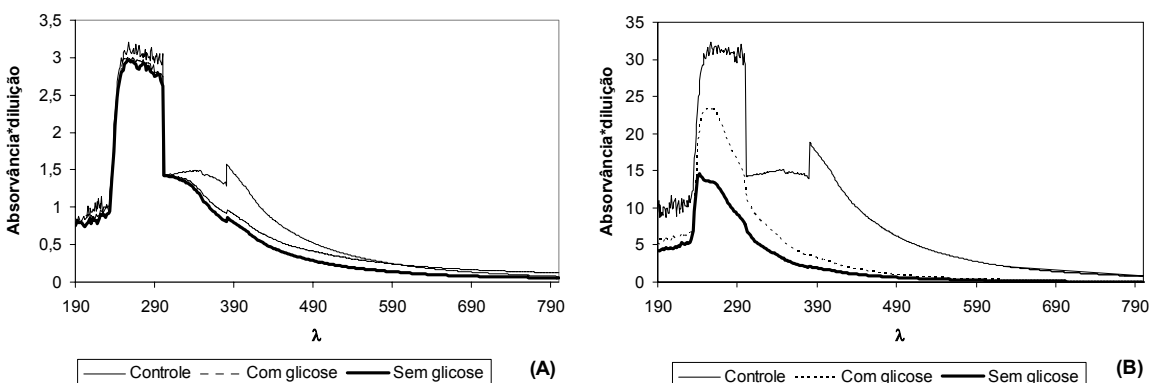


Figura V-4 Varredura de comprimento de onda do óleo cru extraído com clorofórmio para as diferentes concentrações iniciais de petróleo: (A) 0,1 % (v/v); (B) 1,0 % (v/v).

É possível observar que a presença de glicose só se torna relevante quando a concentração de óleo cru é maior (Figura V-4 B), ou seja, a diferença de absorvância para o controle em todos os comprimentos de onda é maior na ausência de glicose, corroborando os dados anteriormente obtidos. Tais fatos podem ser melhor constatados na Tabela V-4, que apresenta a remoção ($Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}} / Abs_{\text{controle}} * 100$) para comprimentos de onda selecionados (208, 266 e 388 nm).

Tabela V-4 - Remoção (%) de petróleo nas condições escolhidas.

Condições		Remoção (%)		
Glicose (mg/mL)	Petróleo (% v/v)	208 nm	266 nm	388 nm
0	0,1	5,6	8,2	45,4
1,0	0,1	5,1	7,5	38,0
0	1,0	54,5	59,7	89,0
1,0	1,0	36,8	29,7	80,4

Observa-se que a remoção por biodegradação é maior para os componentes que emitem luz nos comprimentos de onda próximos a 388 nm. No entanto, em maior concentração de petróleo e na ausência de glicose, é possível remover pelo menos 50% das frações que absorvem nos comprimentos de onda analisados.

VI CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que a levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 tem potencial para biodegradar óleo cru.

Embora o crescimento celular da fase aquosa apresente valores subestimados devido à adesão das células ao óleo cru observa-se algum crescimento após o esgotamento da glicose, indicando que uma parcela do óleo cru assimilado destina-se ao crescimento celular.

Observa-se que a remoção por biodegradação é maior para os componentes que emitem luz nos comprimentos de onda próximos a 388 nm. No entanto, em maior concentração de petróleo e na ausência de glicose, é possível remover mais de 50% de óleo cru para os comprimentos de onda selecionados.

Pode-se também concluir que o óleo cru é utilizado como fonte de carbono para crescimento celular (experimentos sem glicose), embora a presença desta fase orgânica pareça ter algum efeito inibitório no crescimento quando na presença de glicose, uma vez que os níveis de crescimento alcançados com e sem petróleo não são similares. Este fato indicaria que a célula necessita de um período significativo de adaptação para alternar entre o consumo da fonte de carbono facilmente assimilável (glicose) e a utilização do óleo cru.

Nos experimentos contendo apenas glicose como fonte de carbono (na concentração de 1 mg/mL) o crescimento celular alcançou níveis similares aos encontrados nos experimentos com glicose e 1,0 %(v/v) de óleo cru, demonstrando que no tempo avaliado as células estariam consumindo preferencialmente a glicose.

Como conclusão final, pode-se dizer que as melhores condições para a biodegradação do óleo cru por *Yarrowia lipolytica* ocorre a uma concentração inicial de células de 1,0 mg/mL e agitação de 160 rpm para uma concentração de óleo cru de 1,0% (v/v). Os melhores resultados de biodegradação estão associados à maior velocidade de agitação do sistema (160 rpm) visto que a levedura é estritamente aeróbia.

VII SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Análises de biodegradação nas condições escolhidas com os diferentes componentes do petróleo que usualmente são agrupados em frações, cujas principais são: saturada (n-alcanos, alcanos ramificados e cicloalcanos) e aromática.

VIII BIBLIOGRAFIA

Alonso, F.O.M., Oliveira, E.B.L, Dellamora-Ortiz, G.M., Pereira-Meirelles, F.V. (2005). Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. *Brazilian J. Chem. Eng.*, 22(1), 9-18.

Aldrett, S., Bonner, J.S., Mills, M.A., Autenrieth, R.L. and Stephens, F.L. (1997), Microbial degradation of crude oil in marine environments tested in a flask experiment, *Wat. Res.* 31, 2840-2848.

Alkasrawi, M. et al. (1999), *A microbial biosensor based on Yarrowia lipolytica for the offline determination of middle-chain alkanes*. *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 723-727.

Amaral, P.F.F., Rocha-Leão, M.H.M., Marrucho, I. M., Coutinho, J.A.P, Coelho M.A.Z., (2006), *Improving Lipase Production using a Perfluorocarbon as Oxygen Carrier*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81, 1368 - 1374.

Amaral, P.F.F., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.M.V., Rocha-Leão, M.H.M., Coelho M.A.Z., Coutinho, J.A.P, (2006a), *Cell Surface Characterization of Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682.*, *Yeast*, 23, 867-877.

Amaral, P.F.F., da Silva, J.M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.M.V., Marrucho, I., Coelho M.A.Z., Coutinho, J.A.P, (2006b), *Production and Characterization of a Bioemulsifier from Yarrowia lipolytica*, *Process Biochemistry*, 41, 1894-1898.

Barth, G. e Gaillardin, C. (1997), *Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19, 219-237.

Banat, I.M (1995), *Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review*. *Bioresource Technology*, 51, 1-12.

Cammarota, M. C., Carvalho, D. D. (2005) *Apontamentos da disciplina EQB-049 - Biotecnologia Ambiental*, UFRJ.

Caprez, M.A.; Borges, A.L. (2002). *Biorremediação, Tratamento para derrames de petróleo*. *Ciência Hoje* (30), 32-37

Carvalho, P. O. (et al), *Aplicação de Lipases Microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados*, *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 1, 75-80, 2003.

Chen, S.J., Cheng, C.Y. e Chen, T.L. (1999). *A strategy for enhancing lipase production by Acinetobacter radioresistens from n-hexadecane*. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, 30, 4, 283-288.

Fadiglu, S. e Erkmen, O. (1999) *Lipase production by Rhizopus oryzae growing on different carbon and nitrogen sources*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 13, 1936- 1938.

Fenice, M., Selbmann, L., Zucconi, L. *et al.* (1997) Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains. *Polar Biology*, 17, 3, 275-280.

Ferrão, C.M.. Derramamentos de óleo no mar por navios petroleiros. Disponível em <http://www.clubedopetroleo.com.br>. Acesso em 10. agosto.2007

Fickers, P., et al. (2005) Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 5, 527-543.

Haegler, A.N. and Mendonça-Haegler, L.C. (1981). *Yeast from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 (1), 173-178.

Healy, M.G., Devine, C.M. e Murphy, R. (1996), *Microbial production of biosurfactants*. Resources, Conservation and Recycling, 18, 41-57.

Hou, C.T. (1997) *Characterization of new yeast lipases*. Journal of the American Oil Chemists Society, 74, 11, 1391-1394.

Ilori, M.O., Amobi, C.J., Odocha, A.C. (2005), Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment, *Chemosphere*, 61, 985-992.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. e Reetz, M.T. (1999) *Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases*. In: Annual Review of Microbiology, 315-351.

KOMAGATA K., NAKASE T., KATSUYA N. (1964), Assimilation of hydrocarbons by yeast. I.Preliminary screening. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol.10, pp. 313-321.

Kim, T.H., et al (1999), *Identification and characterization of an oil-degrading yeast Yarrowia lipolytica 180*. Journal of Microbiology, 37, 128-135.

IJAH U.J.J. (1998), Studies on relatives capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Management*, vol.18, pp. 293-299.

Lakshmi, B.S., Kanguane, P., Abraham, B. *et al.* (1999) *Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from Candida rugosa (DSM 2031)*. Letters in Applied Microbiology, 29, 1, 66-70.

Leahy and Colwell, 1990, Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, Microbiol Mol Biol Rev.; 54(3): 305-315.

Le Borgne, S., Quintero, R., *Biotechnological processes for the refining of petroleum*, Fuel Processing Technology 81 (2003) 155– 169

Madzak, C., Gaillardin, C., Beckerich, J. (2004), *Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast Yarrowia lipolytica: a review*, Journal of Biotechnology, 109, 63–81.

Monticello, J. D., *Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates*, Current Opinion in Biotechnology 2000, 11:540–546

Mulligan, C.N. (2005), *Environmental applications for biosurfactants*. Environmental Pollution, 133, 183-198.

Neelakantan, S., Mohanty, A.K. e Kaushik, J.K. (1999) *Production and use of microbial enzymes for dairy processing*. Current Science, 77, 1, 143-148.

Nicaud, JM, Madzak, C, Broek, P, Gysler, C, Duboc, P, Niederberger, P, Gaillardin, C (2002) *"Protein expression and secretion in the yeast Yarrowia lipolytica"* FEMS Yeast Res. 3: 371-379.

Nitschke, M. e Pastore, G.M. (2002) *Biossurfactantes: propriedades e aplicações*. Química Nova, 25, 772-776.

Oswal, N., Sarma, P.M., Zinjarde, S.S., Pant, A. (2002), *Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast*, Bioresource Technology, 85, 35–37.

Pereira-Meirelles, F.V., Rocha-Leão, M.H. e Sant'anna, G.L. (1997) *A stable lipase from Candida lipolytica, cultivation conditions and crude enzyme characteristics*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 63-65, 73-85.

Reddy, P.G., Singh, H.D., Roy, P.K. and Buruah, J.N. (1982), *Predominant role of hydrocarbon solubilization in the microbial uptake of hydrocarbons*, Biotechnol. Bioeng. 24, 1241-1269.

Ron, E.Z. e Rosenberg, E. (2002) *Biosurfactants and oil bioremediation*. Current Opinion in Biotechnology, 13, 249-252.

Sugaya, K., Nakayama, O., Hinata, N., Kamekura, K., Ito, A., Yamagiwa, K. E Ohkawa, A. (2001) *Biodegradation of quinoline in crude oil*, J. Chem. Techn. Biotechn., 76, 6, 603-611.

Toren, A., Ron, E.Z., Bekerman, R., Rosenberg, E. (2002) *Solubilization of polyaromatic hydrocarbons by recombinant bioemulsifier AInA*, 59, 580-584.

Zinjarde, S.S., Pant, A.A. (2002), *Hydrocarbon degraders from tropical marine environments*, Marine Pollution Bulletin, 44, 118–121.

Zinjarde, S.S. e Pant, A. (2002), *Emulsifier from a tropical marine yeast, Yarrowia lipolytica NCIM 3589*. Journal of Basic Microbiology, 42, 67-73.

Lee, Jeong-soon, Eun-Jeong Kang, Min-ok Kim, Dong-Hun Lee, Kyung Sook Bae and Chi-Kyung Kim (2000), *Identification of Yarrowia lipolytica Y103 and Its Degradability of Phenol and 4-Chlorophenol*, J. Microbiol. Biotechnol., 11, 112-117.

Referências da Internet:

<http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=235&ordem=2&canal=5>

Acesso em 08/08/2007

<http://www.clubedopetroleo.com.br/ncom/monografias/camila.pdf>

Acesso em 10/08/2007

<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./energia/petroleo/index.html&conteudo=./energia/petroleo/petroleo.html>

Acesso em 10/08/2007.

<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agropecuario/index.html&conteudo=./agropecuario/artigos/biorremediacao.html>

Acesso em 20/08/2007