



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-
BRASILEIRA (UNILAB)
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPPG)
INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL (IEDS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA E AMBIENTE (PGEA)**

MARCELO PEREIRA DE OLIVEIRA

**BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE
POR *Acinetobacter venetianus* AMO1502**

REDENÇÃO-CE

2024

MARCELO PEREIRA DE OLIVEIRA

**BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE
POR *Acinetobacter venetianus* AMO1502**

Dissertação apresentado como requisito para a obtenção do título de mestre em Energia e Ambiente, na Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, UNILAB – Campus das Auroras.

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Maria Valderez Ponte Rocha.

REDENÇÃO-CE

2024

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Oliveira, Marcelo Pereira de.

O42b

Biodegradação de óleo diesel e produção de biossurfactante por
Acinetobacter venetianus AMO1502 / Marcelo Pereira de Oliveira. -
Redenção, 2024.

78f: il.

Dissertação - Curso de Mestrado Acadêmico Em Energia E Ambiente,
Programa De Pós-graduação Em Energia E Ambiente, Universidade da
Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção,
2024.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

1. Óleo diesel. 2. *Acinetobacter venetianus*. 3.
Biossurfactantes. I. Título

CE/UF/BSCA

CDD 665.538

MARCELO PEREIRA DE OLIVEIRA

**BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE
POR *Acinetobacter venetianus* AMO1502**

Dissertação apresentado ao programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente (PGEA), da
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), como
requisito para a obtenção do título de mestre em Energia e Ambiente.

Aprovado em: 21/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Maria Valderez Ponte Rocha (Orientadora)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB

Prof.^a Dra. Maria Cristiane Martins de Souza
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB

Prof. Dr. Ítalo Waldimiro Lima de França
Universidade Federal do Ceará - UFC

RESUMO

Uma das estratégias utilizadas para reduzir o impacto causado pelos acidentes petrolíferos é a biorremediação, um processo que consiste na degradação do óleo pela ação de microrganismos, que podem sintetizar compostos surfactantes acelerando este processo. Para obter uma maior eficiência nesse processo, os microrganismos utilizados precisam se adaptar às condições ambientais e conseguir metabolizar os contaminantes, sendo microrganismos isolados do próprio acidente os mais promissores. Neste contexto, o potencial biorremediador da cepa *Acinetobacter venetianus* AMO1502, uma bactéria isolada do óleo coletado do derramamento ocorrido na costa brasileira em 2019, foi investigado utilizando óleo diesel como fonte de hidrocarboneto. Os experimentos foram conduzidos em diferentes concentrações de óleo diesel (0,5%, 1%, 1,5% e 2% (v/v)) e foi avaliada a produção de compostos de superfície ativa, sendo acompanhada por índice de emulsificação ($IE_{24\%}$) e redução da tensão superficial dos meios. *A. venetianus* AMO1502 reproduziu em meio contendo apenas óleo diesel não estéril como fonte de carbono, indicando a degradação desta fração de hidrocarbonetos. Além disso, a concentração de diesel influenciou o crescimento celular e a produção de compostos surfactantes. O microrganismo apresentou alta adesão (73,5% a 63%), ao óleo diesel, diminuindo com o aumento da concentração de óleo diesel, sendo a adesão uma característica importante para o microrganismo no processo de degradação dos componentes do óleo diesel. Os compostos tensoativos produzidos foram capazes de formar emulsões estáveis utilizando óleo diesel e querosene como fontes hidrofóbicas, obtendo índices de emulsificação nas faixas de 58,8% a 86,5% e 50% a 74,4%, respectivamente. A diminuição da tensão superficial do meio foi observada, reduzida em até 65,9 %, o que sugere a produção de biossurfactantes. A bactéria também degradou compostos de diferente tamanho da cadeia carbônica presentes no diesel. Por exemplo, nas cadeias C_{11} - C_{12} e C_{23} - C_{24} , observou-se uma degradação de 100% e 54%, respectivamente, quando expostas a uma concentração de 2% (v/v) de óleo diesel. Em concentrações de 1,5% (v/v), notou-se uma degradação mais pronunciada em cadeias entre C_{19} - C_{20} e C_{23} - C_{24} , alcançando 62% e 59%, respectivamente. Nas concentrações de 1% e 0,5% (v/v), todas as cadeias carbônicas foram totalmente degradadas após 168 horas de bioprocessamento. Dessa forma, a bactéria isolada, *A. venetianus* AMO1502, mostrou-se eficiente na metabolização de hidrocarbonetos e na produção de um agente de superfície ativa, que poderá contribuir para os processos de biorremediação de compostos derivados do petróleo.

Palavras-chave: *Acinetobacter venetianus*. Óleo diesel. Biossurfactantes.

ABSTRACT

One of the strategies used to reduce the impact caused by oil accidents is bioremediation, which consists of the degradation of oil by the action of microorganisms, which can synthesize surfactant compounds, accelerating this process. To obtain greater efficiency in this process, the microorganisms used need to adapt to the environmental conditions and be able to metabolize the contaminants, with microorganisms isolated from the accident itself being the most promising. In this context, the bioremediation potential of the *Acinetobacter venetianus* AMO1502 strain, a bacterium isolated from the oil collected from the spill off the Brazilian coast in 2019, was investigated using diesel oil as a hydrocarbon source. The experiments were conducted in different concentrations of diesel oil (0.5%, 1%, 1.5%, and 2% (v/v)) and the production of active surface compounds was evaluated, being accompanied by the emulsification index (IE₂₄%) and reduction of the surface tension of the medium. *A. venetianus* AMO1502 reproduced in a medium containing only non-sterile diesel oil as a carbon source, indicating the degradation of this hydrocarbon fraction. In addition, the concentration of diesel influenced cell growth and the production of surfactant compounds. The microorganism showed high adhesion (73.5% to 63%) to diesel oil, decreasing with the increase of diesel oil concentration, and adhesion is an important characteristic for the microorganism in the degradation of diesel oil components. The surfactant compounds produced were able to form stable emulsions using diesel oil and kerosene as hydrophobic sources, obtaining emulsification rates in the ranges of 58.8% to 86.5% and 50% to 74.4%, respectively. A decrease in the surface tension of the medium was observed, reduced by up to 65.9%, which suggests the production of biosurfactants. The bacterium also degraded compounds of different sizes of the carbon chain present in diesel. For example, in the C₁₁-C₁₂ and C₂₃-C₂₄ chains, a degradation of 100% and 54%, was observed when exposed to a concentration of 2% (v/v) of diesel oil. At 1.5% (v/v) concentrations, a more pronounced degradation was observed in chains between C₁₉-C₂₀ and C₂₃-C₂₄, reaching 62% and 59%, respectively. At concentrations of 1% and 0.5% (v/v), all carbon chains were fully degraded after 168 hours of bioprocessing. Thus, the isolated bacterium, *A. venetianus* AMO1502, proved efficient in metabolizing hydrocarbons and producing an active surface agent, which may contribute to the bioremediation processes of petroleum-derived compounds.

Keywords: *Acinetobacter venetianus*. Oil spill. Biosurfactants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 Impactos Ambientais do Petróleo	12
3.1.2 Implicações das Contaminações por Hidrocarbonetos de Petróleo e seus Derivados	15
3.2 Óleo Diesel	16
3.2.1 Biodegradação de óleo Diesel	17
3.3 Remediação Das Áreas Afetadas Por Derramamentos De Óleo Diesel.....	19
3.3.1 Contenção e Recuperação Mecânica (CRM).....	19
3.3.2 Queima <i>in situ</i>	21
3.3.3 Dispersantes.....	22
3.3.4 Biorremediação.....	23
4 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES	28
4.1 Biossurfactantes Produzidos por Bactérias do Gênero <i>Acinetobacter</i>	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 Reagentes.....	35
5.2 Microrganismo.....	35
5.3 Propagação e Cultura do Inóculo em Meio de Produção	35
5.4 Ensaios de Biodegradação e Produção de Biossurfactantes	36
5.6 Métodos Analíticos	37
5.6.1 Crescimento Celular	37
5.6.2 Hidrofobicidade da Superfície Celular	37
5.6.3 Índice de Emulsificação (IE ₂₄ %)	38
5.6.4 Tensão Superficial	38
5.6.5 Extração do Óleo Diesel e Análise de Cromatografia Gasosa	39
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE A – GRÁFICO DE CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DIESEL	79

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de solos e mares por óleo combustível e solventes organoclorados é um problema recorrente, sendo considerado um sério problema ambiental, atraindo olhares e discussões ao público nas últimas décadas (ADIPAH, 2018). Esses solos e mares poluído por derivados de petróleo, como óleo diesel, pode causar impactos negativos no lençol freático adjacente, afetando a flora e fauna que dependem do ecossistema do solo para sua sobrevivência (OKE; NDIRIBE; MUSA, 2020).

Este óleo diesel é definido como hidrocarbonetos produzido por destilação fracionada que se encaixa na faixa de destilados médios de petróleo bruto em temperaturas que variam de 200 °C a 350 °C. Sua composição inclui aproximadamente 64% de hidrocarbonetos alifáticos, com números de carbono predominantemente na faixa de C₁₀-C₂₂, cerca de 35% de hidrocarbonetos aromáticos, incluindo benzeno e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, e aproximadamente 1-2% de hidrocarbonetos olefínicos. O ponto de ebulição do óleo diesel está na faixa de aproximadamente 163-357 °C Gad, (2024) e é aplicado em geradores de energia, transporte rodoviário, transporte ferroviário, embarcações marítimas, em aviação e entre outros setores (ANFILATOV; CHUVASHEV, 2020; ASNADI *et al.*, 2020; AYDIN, 2020; CIPEK *et al.*, 2021; GABIÑA *et al.*, 2019).

Devido às suas diversas aplicabilidades e demandas do mercado, as atividades de produção na indústria petroquímica trazem consigo diversos riscos atrelados a sua exploração, extração, distribuição e comercialização (LUIZ *et al.*, 2017). Portanto, para conter esses riscos e desastres ambientais, novas técnicas estão em constantes estudos como, por exemplo, métodos físico-químicos ou biológicos estão sendo utilizados como uma forma de remoção ou redução, parcial e até completa de poluentes ambientais. Um destes processos é a biorremediação, definida como um processo de biotransformação de compostos químicos tóxicos em substâncias de menor toxicidade, mediado por microrganismos ou enzimas microbianas (DASH; OSBORNE, 2023). Para utilizar a biorremediação no derramamento de óleo, é necessário identificar os microrganismos mais adequados para a degradação do tipo de óleo envolvido. Então, a escolha dos microrganismos e das técnicas adequados é fundamental para o sucesso do processo de biorremediação, bem como o controle dos fatores ambientais (ALORI *et al.*, 2022; CHUAH *et al.*, 2022; PANDEY; SUKHDHANE, 2021). Na biorremediação existe duas abordagens principais de execução, a bioaugmentação e a bioestimulação. Essa última

técnica é a que mais se enquadra a aplicação de biossurfactantes (ERAS-MUÑOZ *et al.*, 2022; LOPES *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2022).

Os biossurfactantes são moléculas que apresentam em sua estrutura uma porção polar e apolar e que possuem a capacidade de diminuir a tensão superficial entre líquidos, sólidos e até mesmo gases (MOREIRA; LYONB, 2022). Diferentemente dos surfactantes químicos produzidos a partir de derivados de petróleo que causam danos ao meio ambiente, os biossurfactantes são produzidos por microrganismo e considerados produtos sustentáveis e biodegradáveis, apresentando menor impacto ambiental (GIRO *et al.*, 2009; JOHNSON *et al.*, 2021; MANGA *et al.*, 2021; NAGTODE *et al.*, 2023; NOGUEIRA FELIX *et al.*, 2019). Essas biomoléculas são amplamente utilizadas em diversas aplicações industriais, como na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, de petróleo e gás, entre outras (SANTOS *et al.*, 2016). Também, os biossurfactantes possuem diversas vantagens em relação aos surfactantes químicos, como maior estabilidade em condições extremas de temperatura e pH, maior eficiência em baixas concentrações e menor toxicidade (DE AGUIAR PEDOTT *et al.*, 2022; GAYATHIRI *et al.*, 2022; PORTAL D'ALMEIDA *et al.*, 2023; ROCHA *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, as vantagens do uso dos biossurfactantes têm sido extensamente pesquisadas, especialmente em relação às suas possíveis aplicações em processos de biorremediação de solos e águas contaminadas por compostos hidrofóbicos, como hidrocarbonetos (DELMAS, 2022; GUDIÑA; TEIXEIRA, 2022). Eles também são utilizados em processos de recuperação avançada de óleo, diminuindo a tensão interfacial entre o óleo e a água, logo, aumentando a produção de petróleo (ABOELKHAIR; DIAZ; ATTIA, 2022).

Essas pesquisas realizadas também priorizam o estudo das fontes de carbono durante o bioprocessamento, além de outros nutrientes no meio, os quais podem afetar a produção e as propriedades dos biossurfactantes produzidos, na qual a utilização de hidrocarbonetos como fonte de carbono pode resultar em biossurfactantes com maior capacidade de solubilizar compostos hidrofóbicos, como os encontrados em derramamentos de óleo (GURKOK, 2021; RIBEIRO; GUERRA; SARUBBO, 2020; VIEIRA *et al.*, 2021). Já a utilização de açúcares pode resultar em biossurfactantes com propriedades emulsificantes adequados para aplicações em indústrias alimentícias e cosméticas (BARBOSA *et al.*, 2022). Neste contexto, foi utilizado óleo diesel S10 contendo 12% de biodiesel (conforme a resolução CNPE nº 3/2023), como fonte de carbono para avaliar a produção de substâncias de superfície ativa, bem como escolhido

como modelo de fração de hidrocarbonetos de derivados do petróleo para avaliação o potencial biorremediador da cepa *Acinetobacter venetianus*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar o potencial de degradação do óleo diesel e produção de compostos de superfície ativa por *Acinetobacter venetianus* AMO1502, microrganismo isolado das amostras de óleo coletadas em Amontada - CE, Brasil, para aplicação como agente biorremediador em locais contaminados por poluentes orgânicos hidrofóbicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o potencial de crescimento da bactéria *Acinetobacter venetianus* AMO1502 usando o óleo diesel como fonte de carbono;
- Avaliar o potencial de degradação do óleo diesel da bactéria *A. venetianus* AMO1502
- Analisar a produção de compostos de superfície ativa, bioemulsificantes ou biossurfactantes, durante o processo de degradação do óleo diesel;
- Investigar a influência da concentração de diesel no processo de biodegradação e na formação de composto de superfície ativa;
- Analisar a hidrofobicidade celular da *A. venetianus* AMO1502 em óleo diesel.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

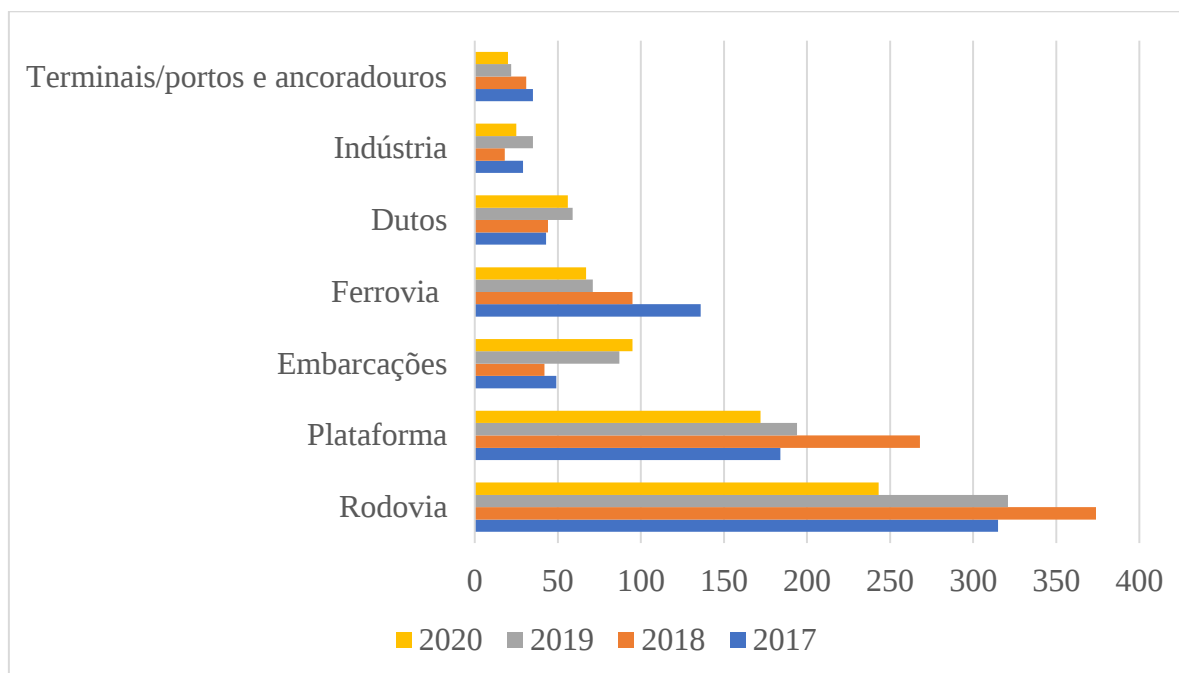
3.1 Impactos Ambientais do Petróleo

O petróleo é composto na sua maioria por hidrocarbonetos e é constituído na sua maioria por compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos muito inflamável (KOSHLAF; S BALL, 2017) contendo 82% de carbono, 12% de hidrogênio, 4% de nitrogênio, 1% de oxigênio, 0,5% de sais que raramente aparecem e 0,5% de metais como cobre e ferro (ANP, 2023). Segundo Ben (2023), o petróleo e seus derivados participaram com uma porcentagem de 35,7% no ano de 2022, 34,2% em 2021 e 32,9% em 2020 da matriz energética referente a fonte de energia de fontes não renováveis.

O uso extensivo desses hidrocarbonetos como fonte de energia resulta em sua contaminação no solo e na água. Cerca de 5,8 milhões de toneladas de hidrocarbonetos foram introduzidas nos corpos hídricos oceânicos, em decorrência de eventos de grandes proporções envolvendo a exploração, transporte e armazenamento de petróleo, afetando negativamente as propriedades bioquímicas e físico-químicas do solo, limitando o crescimento e o desenvolvimento das plantas (AHMED; FAKHRUDDIN; FAKHRUDDIN, 2018; ZAPELINI DE MELO *et al.*, 2022).

O aumento das atividades de exploração do petróleo, acarreta consequentemente em um aumento significativo em acidentes ambientais, como é possível verificar na Figura 1. De acordo com dados do Ibama, o maior número de acidentes envolvendo derramamento de óleo ocorre em rodovias, totalizando 1.253 acidentes entre os anos de 2017 e 2020 no Brasil. Em segundo lugar estão as plataformas, com 818 acidentes registrados (IBAMA, 2020).

Figura 1 – Registros de ocorrências por derramamento de óleo entre os anos de 2017-2020 no Brasil.



Fonte: (IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2021).

Esses acidentes decorrentes de derramamento de óleo vêm sendo relatados por décadas de forma mundial, tornando-se cada vez mais frequentes, iniciado em 1910 com um dos primeiros e grandes relatos de derramamento terrestre com o Lakeview Gusher. Os relatos se tornaram mais frequentes no início da década de 1960, mas só no final de 1960 foram relatados sobre os impactos na vida selvagem. Já na década de 1970, os registros de derramamento tornaram-se mais comuns a partir de outras fontes que não os petroleiros (CHILVERS; MORGAN; WHITE, 2021).

Ao longo da última década, o cenário global tem sido marcado por uma série preocupante de acidentes relacionados a derramamentos de petróleo em águas oceânicas, em novembro de 2002, ocorreu um significativo derramamento de petróleo na costa galega. O incidente envolveu o petroleiro Prestige, que transportava uma carga de aproximadamente 77.000 toneladas de óleo pesado (PÉREZ-DEL-OLMO; RAGA; KOSTADINOVA, 2022). No período compreendido entre 2019 e 2020, ocorreu a deposição de petróleo bruto em ecossistemas costeiros, incluindo praias, áreas de pesca, estuários e zonas úmidas litorâneas, resultando em um impacto que se estendeu por aproximadamente 3.000 quilômetros da linha costeira do Brasil. Estudos indicaram que

a descarga total de petróleo bruto nesse contexto atingiu um valor estimado de mais de 5.000 toneladas (TESSAROLO *et al.*, 2023).

Para minimizar os impactos causados por derramamento de óleo aqui no Brasil, foram criados leis e decretos para resguardar tais acontecimentos, por exemplo, a Portaria do Ministério dos Transportes Nº 124 de 20/08/80 que exige que as indústrias potencialmente poluidoras e as construções ou estruturas que armazenem substâncias também potencialmente poluidoras, se instalem a uma distância mínima de 200 metros dos corpos d'água. Também, pode ser citado a Política Nacional do Meio Ambiente, com a Lei Federal Nº 6.938 de 31 de agosto de 1981, com o objetivo a preservação, melhoria e recuperação da qualidade ambiental propícia à vida, visando assegurar, no país, condições ao desenvolvimento socioeconômico, aos interesses da segurança nacional e à proteção da dignidade da vida humana, e a Lei Federal Nº 9.537 de 11 de dezembro de 1997 que dispõe sobre a segurança do tráfego aquaviário em águas sob jurisdição nacional.

Entre países também existem convenções internacionais que visam estabelecer padrões mínimos a serem seguidos por cada país. Alguns desses acordos têm como objetivo reduzir os acidentes que representam riscos para o meio ambiente. Aqui no Brasil, segundo a Agência Nacional de Transportes Aquaviários (ANTAQ), é seguido a Convenção Internacional para Prevenção da Poluição por Navios - MARPOL 73/78, Convenção Internacional sobre Mobilização de Recursos, Resposta e Cooperação contra Poluição por Óleo - OPRC-90, promulgada pelo Decreto nº 2.870, de 10 de dezembro de 1998, Convenção sobre a Prevenção da Poluição Marinha por Alijamento de Resíduos e Outras Matérias – Convenção de Londres – 72, internalizada pelo Decreto nº 87.566, de 16 de setembro de 1982, também a Convenção Internacional sobre Responsabilidade Civil em Danos Causados por Poluição por Óleo - CLC-69.

Apesar das medidas implementadas para minimizar os efeitos do derramamento de óleo, a realidade persiste desafiadora, evidenciando a complexidade intrínseca das operações relacionadas à exploração e transporte de petróleo e exigindo um constante aprimoramento das políticas de segurança ambiental.

3.1.2 Implicações das Contaminações por Hidrocarbonetos de Petróleo e seus Derivados

A contaminação química da água subterrânea causada por macropoluentes e os micropoluentes de petróleo é um tema de grande preocupação e destaque no mundo devido aos seus impactos ambientais significativos. Essa contaminação ocorre quando compostos químicos como sulfurados, nitrogenados e aromáticos, provenientes do petróleo, infiltram-se no subsolo e atingem as reservas de água subterrânea (COSTA; SANTOS; DOS ANJOS, 2023). Por exemplo, foi possível constatar no Delta do Níger, uma região caracterizada pela frequente atividade de armazenamento e exploração de petróleo bruto que as águas subterrâneas estão sofrendo contaminação devido à infiltração de hidrocarbonetos provenientes do petróleo (ZHANG *et al.*, 2020).

A contaminação por petróleo e seus derivados exerce uma influência abrangente sobre as características do solo, afetando sua fertilidade e suas funções ecológicas. Essa poluição pode resultar em alterações físicas, químicas e biológicas do solo, comprometendo sua capacidade de sustentar o crescimento e desenvolvimento saudáveis das plantas, bem como afetar negativamente a biodiversidade e o equilíbrio dos ecossistemas (KORSHUNOVA *et al.*, 2019).

Os derivados de petróleo como o óleo diesel, gasolina, querosene, óleos lubrificantes, líquidos de corte, óleo combustível, óleos pesados e solventes são considerados os principais agentes de contaminação nos locais onde ocorreram incidentes durante o transporte de petróleo bruto ou produtos derivados do seu processamento (RAKOWSKA, 2020; SINGH *et al.*, 2020). Entre os compostos derivados liberados no ecossistema, destaca-se uma quantidade significativa de combustíveis como óleo diesel e gasolina utilizados para propulsão de veículos ou transportados como carga (RAKOWSKA, 2020). Estes compostos são identificados em produtos comerciais, inclusive no óleo combustível, que é uma mistura complexa de hidrocarbonetos contendo moléculas alifáticas e aromáticas (SAMPAIO *et al.*, 2019). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e os compostos monoaromáticos, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), são considerados os principais compostos problemáticos em relação à contaminação ambiental. Essas substâncias são conhecidas por sua toxicidade e persistência no meio ambiente (DELLA-FLORA *et al.*, 2020).

Essas contaminações causadas por derramamentos de óleo têm impactos significativos não apenas no ecossistema marinho, mas também em diversas atividades

relacionadas, como pesca, turismo, agricultura marinha e indústrias de petróleo são altamente afetados por esses incidentes (DHAKA; CHATTOPADHYAY, 2021).

A liberação de óleo nas águas costeiras e sua subsequente deposição nos sedimentos que cobrem as raízes das árvores de mangue pode ter consequências desastrosas para a vida marinha, especialmente considerando que os manguezais são um importante berçário e habitat para muitas espécies (SEVESO *et al.*, 2021). O óleo pode causar danos físicos e fisiológicos aos animais, incluindo asfixia, obstrução de vias respiratórias, comprometimento da capacidade de natação e migração, além de efeitos tóxicos decorrentes dos compostos presentes no petróleo. No caso de um derramamento pesado de petróleo bruto, a alta viscosidade e densidade do óleo podem resultar na cobertura da superfície externa dos répteis marinhos. Isso representa uma séria ameaça à sobrevivência dessas espécies (RUBERG; WILLIAMS; ELLIOTT, 2021). O petróleo bruto, com sua consistência densa, já representa uma ameaça séria para os ecossistemas marinhos em caso de derramamento (SAADOUN, 2015). Quando combinado com o óleo diesel, a situação se agrava ainda mais, tornando a sobrevivência das espécies locais uma verdadeira batalha contra a poluição (NWINYI *et al.*, 2014).

3.2 Óleo Diesel

O óleo diesel é um destilado leve do petróleo, com uma faixa de carbono de C₁₀-C₂₂ e de destilação geralmente entre 170 °C e 380 °C à pressão atmosférica. Devido à eficiência termodinâmica superior do motor de combustão interna diesel em comparação com o motor a gasolina, o óleo diesel ocupa uma posição de destaque na matriz de combustíveis veiculares, refletindo sua maior demanda em relação a outros derivados (LEONARDO; DWECK; MURTA VALLE, 2019), e suas características permitem sua utilização em motores de veículos do ciclo diesel.

Além disso, o óleo diesel para uso rodoviário é comercializado em todo o território nacional, seguindo rigorosamente todos os regulamentos estabelecidos pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), sendo sua classificação realizada de acordo com a Resolução ANP N° 50, de 23 de dezembro de 2013 em:

I. Óleo diesel A: combustível produzido nas refinarias, nas centrais de matérias-primas petroquímicas e nos formuladores, destinado a veículos dotados de motores do ciclo Diesel, de uso rodoviário, sem adição de biodiesel;

II. Óleo diesel B: óleo diesel A adicionado de biodiesel no teor estabelecido pela legislação vigente.

No caso do óleo diesel A S10 e B S10, o teor de enxofre deve ser no máximo de 10 mg/kg, enquanto para o óleo diesel A S500 e B S500, o limite máximo é de 500 mg/kg de teor de enxofre. Além da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel anualmente segundo a resolução N° 3, de 20 de março de 2023, com adição mínima de 12% em 2023.

Devido à alta demanda no mercado de óleo diesel, sendo considerado o combustível mais consumido no Brasil, principalmente devido à sua ampla utilização no transporte rodoviário e marítimo de passageiros e cargas Martins; Monticelli; Mulinari (2020), há um aumento nas atividades de extração, transporte e armazenamento, o que pode resultar em possíveis acidentes de derramamento durante o processo.

Alguns desses acidentes envolvendo derramamento de óleo diesel foram relatados, como o ocorrido em 2020, no qual um duto da Petrobrás que conectava a Refinaria Duque de Caxias (Reduc) ao terminal Ilha d'Água, na Ilha do Governador, rompeu-se, resultando em um vazamento de 1,3 milhão de litros de óleo combustível nas águas da baía (GRANDELLE, 2020). Outro acidente foi um descarrilhamento de trem no Porto das Caixas, Itaboraí/RJ, onde despejou 60 mil litros de óleo diesel em uma região habitada (RODRIGUES; LINO; PACHECO-FERREIRA, 2009). Ao longo dos anos outros relatos foram noticiados, como o acidente envolvendo uma carreta e um caminhão-tanque, que resultou no vazamento de 35 mil litros de diesel na Rodovia dos Bandeirantes, em Jundiá (TOMAZELA, 2023). Com o aumento crescente dos casos de derramamento de óleo diesel, a preocupação com os danos causados por acidentes tem aumentado, o que tem impulsionado estudos mais aprofundados sobre os efeitos causados e estratégias para tratamento, buscando novas formas de degradar o óleo diesel.

3.2.1 Biodegradação de óleo Diesel

A degradação biológica dos hidrocarbonetos é um processo que depende da natureza e da quantidade destes compostos presentes no ambiente contaminado (MACIEL, 2013). Em solos contaminados a amplitude da decomposição biológica de hidrocarbonetos é profundamente influenciada por quatro elementos essenciais, incluindo a criação de condições ambientais ideais para promover a atividade de decomposição biológica, os tipos predominantes de hidrocarbonetos de petróleo na matriz contaminada

e a disponibilidade dos contaminantes para os microrganismos (MÁRQUEZ-ROCHA; HERNÁNDEZ-RODRÍ; LAMELA, 2001).

A degradação de hidrocarbonetos como o óleo diesel é um processo complexo que geralmente requer diferentes espécies microbianas ou consórcios com capacidades enzimáticas específicas, acelerando assim a taxa de degradação do óleo (MORALES-GUZMÁN *et al.*, 2017). Algumas cepas de microrganismos são capazes de degradação o óleo diesel, entre elas estão os gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Alcanivorax*, *Alteromonas*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Arthrobacter*, *Methylobacterium* e *Phenylobacterium* são microrganismos bem conhecidos envolvidos na biodegradação de hidrocarbonetos (CHAUDHARY *et al.*, 2021). Obviamente, as cepas bacterianas com alta eficiência de degradação são essenciais para a remediação do solo contaminado com óleo diesel (SUN *et al.*, 2019).

Embora haja uma variedade maior de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, o crescimento de certos microrganismos em substratos de hidrocarbonetos pode ser limitado por vários fatores, como a recalcitrância do substrato e a baixa solubilidade de compostos orgânicos em sistemas aquosos, o que limita sua biodisponibilidade para biodegradação (MNIF *et al.*, 2015).

Porém alguns microrganismos possuem a capacidade de degradar compostos recalcitrantes, e isto é consequência da evolução dos aparatos enzimáticos presentes nas células junto a uma enorme variedade de substâncias naturais de origens diversas (MACIEL, 2013). Portanto, é essencial a realização de estudos laboratoriais para fornecer um maior controle e manipulação ao oferecer uma base para distinguir entre processos bióticos e abióticos e para determinar as condições ideais para a biodegradação (AMEEN *et al.*, 2016). A partir disso, surgiu a necessidade de estudar a degradação e de remediar áreas poluídas pelo óleo induziu o desenvolvimento de novas tecnologias para desintoxicar contaminantes não apenas através de métodos químicos ou físicos, mas também através de técnicas biológicas (AMEEN *et al.*, 2016).

3.3 Remediação Das Áreas Afetadas Por Derramamentos De Óleo Diesel

Como relato nos tópicos anteriores, a produção e o transporte de petróleo *offshore* representam uma ameaça aos ecossistemas marinhos devido aos derrames, que podem causar impactos ambientais, sociais e financeiros enormes, com efeitos a longo prazo que podem ser sentidos por décadas (KERAMEA *et al.*, 2021). Preocupados com os impactos causados pelo derramamento de petróleo e seus derivados, como o óleo diesel, pesquisadores têm buscado novas estratégias para o tratamento desses poluentes. Entre os métodos investigados para remediar o óleo diesel estão abordagens físicas, químicas e biológicas (HADIBARATA; VOIJANT TANGAHU, 2021).

Um dos métodos físicos que pode ser aplicado, segundo Nadim *et al.*, (2000), é a extração de vapor do solo, definida como um processo de limpeza *in situ*, o que significa que os solos podem ser remediados sem perturbação ou escavação. Na extração de vapor do solo, o ar atmosférico fresco é colocado em contato com a subsuperfície contaminada por meio de um vácuo induzido. O fluxo contínuo de ar através do solo poroso remove o composto de fase líquida não aquosa (NAPL), bem como as fases dissolvidas e sorvidas no ar em movimento. Quando aplicado no campo, melhores resultados podem ser obtidos se o estrato do subsolo for uniforme, com alta porosidade e baixo teor de umidade, e se as correntes de ar seguirem um caminho horizontal (NADIM *et al.*, 2000).

Já um método químico é a aplicação de oxidantes químicos, uma alternativa promissora à dessorção térmica para a remediação de solos contaminados com compostos orgânicos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). Para a aplicação em campo, uma questão importante é a seleção das doses ideais da solução oxidante, ou seja, do oxidante e dos catalisadores e/ou aditivos apropriados (RANC *et al.*, 2016). Outros métodos são abordados na literatura e serão reportados a seguir.

3.3.1 Contenção e Recuperação Mecânica (CRM)

A contenção e recuperação mecânica (CRM) refere-se às operações empreendidas com o objetivo de eliminar os hidrocarbonetos da superfície da água. Essas ações envolvem tanto a implementação de barreiras físicas como ilustrado na Figura 2,

para conter a mistura líquida de hidrocarbonetos e água, quanto a utilização de *skimmers* ou materiais solventes para recuperar os hidrocarbonetos derramados (HU *et al.*, 2020).

Figura 2 – Barreiras de contenção utilizadas para conter derramamentos de óleo em ambiente marinho.



Fonte: (NETO; JUNIOR; GIANNINI, 2020)

O *skimmers* recupera óleos que estão na superfície da água por meio de técnicas de escumação, como o uso de correias oleofílicas, cordas e discos, ou por meio de sistemas de bombeamento e sucção, como mostrado na Figura 3. Com base nas condições específicas, especialmente na rugosidade da água circundante, é possível empregar *skimmers* autopropelidos, *skimmers* controlados remotamente a partir da costa ou da própria embarcação. Já os materiais solventes se referem a um material insolúvel e hidrofóbico, como o polipropileno, que é empregado para adsorver ou absorver a fase oleosa presente na água, os quais podem ser divididos em três classes distintas: inorgânicos, orgânicos sintéticos e orgânicos naturais (PENG *et al.*, 2020; PIAO *et al.*, 2023; VELKOVÁ; HYBSKÁ; BUBENÍKOVÁ, 2023).

Figura 3 – *Skimmers* destinados a fazer a remoção do óleo confinado nas barreiras de contenção.



Fonte: (ELASTEC, 2024)

3.3.2 Queima *in situ*

A queima *in situ* (ISB), a qual é ilustrada na Figura 4, é um processo de queima de petróleo bruto no ponto do derramamento, como medida de contenção para controle do derramamento de óleo. Geralmente é aplicado como um dos últimos recursos para evitar que o óleo derramado atinja habitats ecologicamente sensíveis e atividades recreativas em áreas costeiras (BARSTON, 2022).

Figura 4 – Queima *in situ* para remediação de locais afetados por derramamento de óleo.



Fonte: (BARSTON, 2022).

Esse método é considerado altamente eficiente e rápido para remover o óleo, porém sua eficácia é limitada devido à emulsificação natural do óleo. Para que a ignição ocorra, a mancha precisa ter aproximadamente 3 mm de espessura e o teor de água deve ser inferior a 25%. Quando aplicada em águas calmas antes da emulsificação da mancha na água, a remoção pode chegar a 95%. No entanto, os efeitos negativos da queima *in situ* incluem poluição atmosférica severa, afundamento de resíduos queimados, e riscos de incêndios secundários ou explosões (PETE; BHARTI; BENTON, 2021). Essa técnica pode provocar risco de sufocamento de aves marinhas ou de zonas costeiras e podem expor as comunidades pelágicas e bentônicas a compostos tóxicos (JOHANN *et al.*, 2021)

3.3.3 Dispersantes

Os dispersantes químicos são frequentemente aplicados em águas contaminadas como resposta de emergência a derramamentos de óleo marinho, como mostrado na Figura 5. Esses compostos facilitam a dissolução do petróleo na água, reduzem a quantidade de acúmulo de petróleo na superfície da água e diminuem a entrega de hidrocarbonetos aos ecossistemas costeiros. Além disso, os dispersantes químicos podem potencialmente estimular a biodegradação microbiana do petróleo, aumentando a área superficial do petróleo. No entanto, os impactos dos dispersantes nos microrganismos, em sua atividade e ecologia, ainda são amplamente desconhecidos (KLEINDIENST; PAUL; JOYE, 2015).

Figura 5 – Aplicação de dispersantes em mancha de óleo no mar.



Fonte: (OILCHANGE INTERNATIONAL, 2018).

Os dispersantes têm sido considerados uma ferramenta eficaz no combate a derramamentos de óleo Zhu *et al.*, (2022), desde sua primeira aplicação no acidente envolvendo o *Torrey Canyon* em 1967 (PRINCE, 2023). Havendo outras aplicações como o derramamento de óleo da Deepwater Horizon (DwH) em 2010, onde registrou um volume recorde de aplicação de dispersantes, totalizando 1,4 milhão de galões na superfície e 0,77 milhão de galões na região do poço (ZHU *et al.*, 2022).

Entre os dispersantes disponíveis, o Corexit® EC9500A é um dos dispersantes mais amplamente disponíveis na América do Norte. A composição deste dispersante inclui sulfosuccinato de dioctil sódio (DOSS), éter n-butílico de dipropilenoglicol (DPnB) e destilados leves de petróleo tratados com hidrogênio (YANG *et al.*, 2022).

Entretanto, a aplicação desses dispersantes traz desvantagens, como a exposição de um grande volume de água do mar a uma mistura de dispersante e óleo disperso, levantando preocupações quanto aos possíveis efeitos tóxicos nos organismos marinho. Além disso, a adição de mais produtos químicos à área impactada também é uma preocupação, apesar das várias tentativas realizadas para reduzir a toxicidade dos dispersantes químicos (LIU; CALLIES, 2019).

Devidos aos riscos enfrentados nas aplicações desses dispersantes, outros agentes, como os biológicos, têm recebido crescente atenção recentemente devido à sua eficácia e custo mais baixo (RAZZAK *et al.*, 2022). Esses agentes envolvem o uso de bactérias, fungos e algas para fins de biorremediação, um método de tratamento alternativo comprovado que pode ser empregado em áreas contaminadas com petróleo (SAYED; BALOO; SHARMA, 2021).

3.3.4 Biorremediação

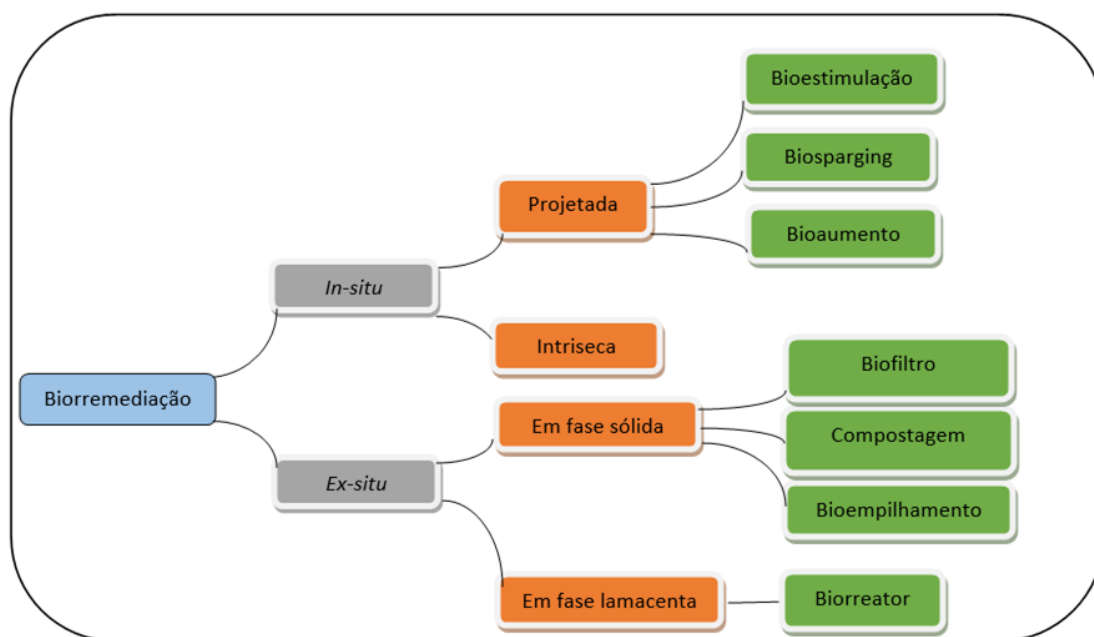
A biorremediação consiste na tecnologia em que mecanismos biológicos são utilizados para degradar contaminantes ambientais diversos, embora a maioria dos estudos esteja voltados para os hidrocarbonetos (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016). Esse processo engloba a utilização de microrganismos, enzimas, plantas (fitorremediação), minhocas com compostos orgânicos (vermirremediação) e o uso de interações micróbio-pesticida para alcançar a

biorremediação inteligente do solo com o propósito de promover a degradação e conversão de contaminantes em uma forma ambientalmente menos tóxica.

Diversas espécies de arqueas, bactérias, algas e fungos têm sido identificados e apresentaram propriedades para serem aplicados na área de biorremediação (ANSARI *et al.*, 2023; BHATT; CHEN; MURPHY, 2023; RAKLAMI *et al.*, 2022; ROMEH, 2022; SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018). Além disso, os microrganismos desempenham um papel crucial na biotransformação ambiental, por meio de processos de desintoxicação, degradação, mineralização e acúmulo de diversos tipos de poluentes nocivos e biodegradáveis. Esses microrganismos são capazes de converter essas substâncias em formas menos tóxicas, contribuindo assim para a redução do impacto ambiental (PATEL *et al.*, 2022).

Essa técnica de biorremediação vem sendo avaliada como a melhor alternativa para solucionar impactos ambientais no meio aquático por ser considerado seguro, economicamente viável, ambientalmente sustentável e capaz de promover a remoção de contaminantes por meio do aumento da taxa de biodegradação (BALA *et al.*, 2022). Entre vários métodos, tem-se a técnica natural, realizada por plantas ou microrganismos que são lançados em corpos d'água produzindo uma série de efeitos, como o consumo de O₂ e eutrofização dos mananciais, além de minimização ou retirada de gosto e odor nas fontes de abastecimento de água (ALAMGIR; SAHA, 2023; PANDE *et al.*, 2020).

As estratégias de biorremediação, como ilustrado na Figura 6, apresentam a capacidade de biodegradar de forma efetiva uma ampla gama de poluentes, incluindo aqueles persistentes, tornando-se uma abordagem viável e eficiente para mitigar a contaminação do solo. A seleção entre as estratégias *in-situ* e *ex-situ* de remediação biológica mais adequadas e viáveis depende de análises preliminares das condições ambientais, tipo de poluente, composição do solo, custos associados à remoção e disponibilidade de tempo para o tratamento (SALES DA SILVA *et al.*, 2020).

Figura 6 - Abordagens de biorremediação.

Fonte: Autor.

No contexto das técnicas *ex-situ*, encontra-se a fase sólida, que é composta por biofiltro, a qual envolve a passagem de poluentes orgânicos em fase de vapor, como hidrocarbonetos, através de um leito de solo, onde eles aderem à superfície do solo e são subsequentemente desintegrados por microrganismos presentes. Os filtros podem ser preenchidos com cepas específicas de bactérias que têm preferência por degradar compostos específicos (PATEL *et al.*, 2022). Além da biorremediação por meio da compostagem, que depende da diversidade da comunidade microbiana, sendo essencial otimizar parâmetros cruciais, como nutrientes (relação C/N = 25–30), umidade (na faixa de 55-65%), e níveis de oxigênio (O₂ acima de 10%) para alcançar um processo de biorremediação bem-sucedido (LIN *et al.*, 2022). Por fim, a biorremediação por bioempilhamento que envolve o uso de pilhas compostas ou leiras controladas para acelerar a degradação de poluentes orgânicos no solo, empregado em cenários nos quais ocorre a contaminação do solo ou da água por substâncias orgânicas (PASSOS; RODNISTZKY, 2023). Já na fase lamacenta, tem-se os biorreatores de lama que representam sistemas de biorremediação altamente sofisticados e estão entre as tecnologias *ex-situ* mais eficazes utilizadas para o tratamento de solos contaminados por

poluentes persistentes em condições ambientais controladas (CRISTOREAN *et al.*, 2016).

A biorremediação *in situ* podem ser classificadas como biorremediação intrínseca ou projetada (SALES DA SILVA *et al.*, 2020). A biorremediação intrínseca é uma abordagem não invasiva que visa remediar locais contaminados de forma sustentável, aproveitando e estimulando a população microbiana já presente no ambiente. Essa técnica envolve a utilização dos processos naturais de biodegradação realizados por microrganismos para remover ou transformar os constituintes poluentes presentes no local contaminado (BALA *et al.*, 2022). Já a biorremediação projetada é uma abordagem que se fundamenta na potencialização das taxas de biodegradação de substâncias específicas, por meio do estímulo ao crescimento de organismos adequados, além da otimização das condições ambientais necessárias para a realização das reações de desintoxicação (ZAGHLOUL; SABER, 2019).

Entre as projetadas tem-se a bioestimulação, baseada na adição de nutrientes para promover o crescimento da comunidade microbiana nativa, sendo um método de biorremediação que aproveita os microrganismos nativos de um ambiente contaminado para degradar poluentes (MANSOURI *et al.*, 2022; SRAVYA; SANGEETHA, 2022). Já a bioaumentação que consiste em uma estratégia ambientalmente amigável e, em termos conceituais, envolve a introdução de nutrientes (compostos contendo nitrogênio e fósforo) com o objetivo de eliminar um poluente ou contaminante significativo em um contexto específico (LOPES *et al.*, 2022). Durante esse processo, a produção de biossurfactantes envolvendo microrganismos apropriados pode ser estimulada através de bioaumento, uma vez que os microrganismos nativos raramente demonstram uma eficiência satisfatória (ŁAWNICZAK; MARECIK; CHRZANOWSKI, 2013).

Em ambientes marinhos, a biorremediação *in situ* apresenta algumas desvantagens que precisam ser consideradas. Essas desvantagens incluem a baixa disponibilidade de nutrientes, a competição da fonte de carbono com outros microrganismos autóctones, a dispersão ou diluição do agente de biorremediação, bem como os efeitos do pH e da temperatura (VALDIVIA-RIVERA *et al.*, 2021).

Um aspecto notável a ser destacado é que a biorremediação mediada por biossurfactantes (BS-MEOR) representa uma abordagem altamente promissora para abordar a contaminação por petróleo e hidrocarbonetos em uma variedade de ambientes. A flexibilidade dessa técnica permite que ela seja aplicada diretamente no local afetado (*in situ*) ou em instalações controladas (*ex situ*), proporcionando aos especialistas a

liberdade de escolher a estratégia de tratamento mais adequada às condições específicas de cada situação (S.J.; BANAT; JOSHI, 2018). Além disso o metabolismo microbiano de microrganismos nativos é frequentemente explorado na biorremediação para a degradação de contaminantes ambientais, já que estão adaptados às condições locais, podendo ser altamente eficazes na degradação de contaminantes (RAFFA; CHIAMPO, 2021).

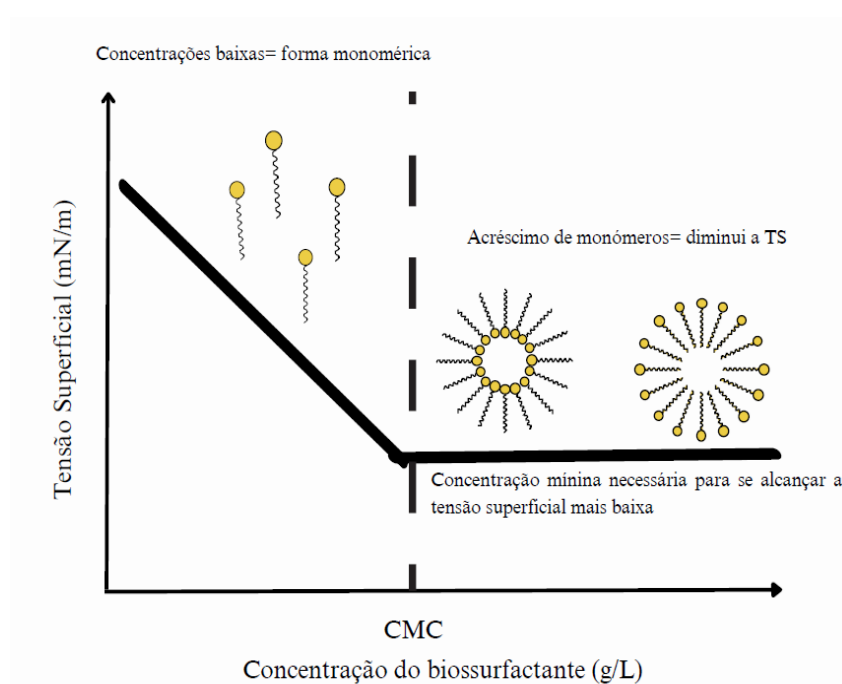
Então, medidas biocorretivas visam aumentar a população microbiana criando condições ambientais propícias para o seu desenvolvimento e sua utilização. Essas medidas dependeram de vários fatores, dentre eles os tipos de microrganismos presentes, as condições do local como pH, água no solo, quantidade de nitrogênio, potássio, fosfato, a quantidade e a toxicidade dos contaminantes (NOGUEIRA FELIX *et al.*, 2019; PORTAL D'ALMEIDA *et al.*, 2023).

4 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

Os surfactantes, conhecidos como "agentes ativos em superfície", são compostos anfifílicos caracterizados pela presença de domínios polares e apolares. Eles formam diversos tipos de agregados, como micelas, cuja formação ocorre em uma concentração crítica conhecida como "Concentração Micelar Crítica" (CMC) a qual pode ser observada na Figura 7 (KHALFALLAH, 2024).

A Concentração Micelar Crítica (CMC) é o valor mínimo de concentração de surfactante necessário para atingir a menor tensão superficial possível. Quando a CMC é alcançada, as moléculas anfipáticas se agregam, com as partes hidrofílicas orientadas para fora e as partes hidrofóbicas orientadas para dentro da estrutura micelar (SARUBBO *et al.*, 2022). Os surfactantes podem existir em diferentes estados de agregação, como monômeros, agregados pré-micelares, micelas e lipossomas, cada um exibindo propriedades distintas em termos de sua capacidade de interação química (MOREIRA; LYONB, 2022).

Figura 7 - Formação de micelas e o ponto de interseção para determinar a Concentração Micelar Crítica (CMC).

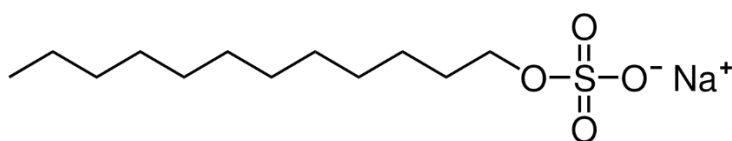


Fonte: Autor (2023).

Além dos seus estados de agregados, a sua estrutura molecular dá quaisquer propriedades de interface físico-químicas importantes do surfactante, como sua capacidade de emulsificação, espalhamento, resistência e solubilidade, o que torna essas moléculas muito aplicável na indústria e na pesquisa (LOOR URGILÉS, 2022).

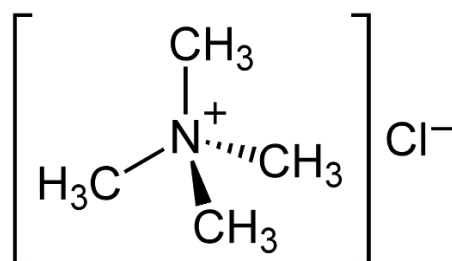
Os surfactantes podem ser categorizados em distintos grupos de acordo com a polaridade da porção hidrofílica da molécula. Estes grupos incluem os aniônicos (com carga negativa) demonstrado na Figura 8, os catiônicos (com carga positiva) representado na Figura 9, os anfotéricos (que possuem tanto íons negativos quanto positivos), podendo ser visto um exemplo na Figura 10 e os não iônicos (sem carga) podendo ser constatado na Figura 11 (JOHNSON *et al.*, 2021).

Figura 8 – Dodecil sulfato de sódio

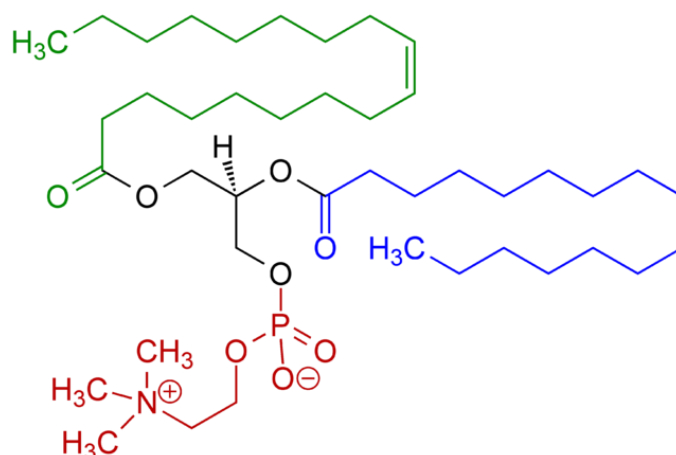


Fonte: (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2024)

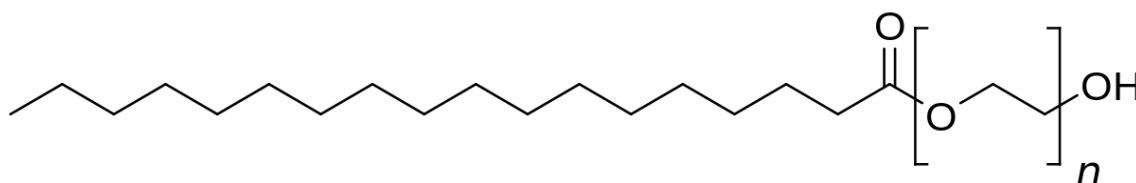
Figura 9 – Cloreto de tetrametilamônio



Fonte: (WIKIPÉDIA, 2023)

Figura 10 - Lecitina

Fonte: (WIKIPÉDIA, 2022)

Figura 11 - Polietilenoglicol monoestearato

Fonte: (WIKIPÉDIA, 2018)

Também, eles podem ser separados em três categorias baseado na sua obtenção/produção: (i) tensoativos sintéticos como o dodecil sulfato de sódio (SDS), (ii) surfactante de base biológica como os soforolipídios, e (iii) biossurfactantes microbianos como os lipopeptídeos (MOLDES *et al.*, 2021).

Os tensoativos sintéticos são produzidos sinteticamente, a partir de fontes não renováveis, com estrutura final diferente dos componentes naturais das células vivas (MOLDES *et al.*, 2021). Esses tensoativos são amplamente utilizados na formulação de macro-micro-nano-emulsões e espumas em diversos setores, como lavanderia e detergentes, cosméticos e produtos farmacêuticos, condicionamento de alimentos, tintas emulsificadas, explosivos, recuperação avançada de óleo e tratamento de águas residuais (FORGIARINI; MARQUEZ; SALAGER, 2021). Porém os surfactantes de origem sintética manifestam várias desvantagens, tais como uma biodegradabilidade reduzida, uma toxicidade acentuada e uma menor consonância com o contexto ecológico (BIANCO

et al., 2023). Além do potencial de influenciar o crescimento de microrganismos e algas na água, podendo assim prejudicar a cadeia alimentar do ecossistema aquático (MADANI *et al.*, 2019).

Devido às suas desvantagens, atualmente tem-se preocupado com os impactos ambientais dos surfactantes sintéticos, despertando desta forma um interesse significativo na busca por biossurfactantes provenientes de fontes naturais (GAUR *et al.*, 2022). Como os surfactantes microbianos que são uma ampla variedade de biomoléculas anfipáticas produzidas por várias fontes microbianas e estas substâncias foram extensivamente estudadas devido às suas propriedades de redução da tensão superficial (MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021; PORTAL D'ALMEIDA *et al.*, 2023).

Existem diversos microrganismos como, por exemplo, do gênero *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium* capazes de produzir biossurfactantes, que podem ser liberados para o meio externo ou fixados às superfícies celulares (ERAS-MUÑOZ *et al.*, 2022; KUMARI *et al.*, 2021; M. STAINSBY; HODAR; VAUGHAN, 2022; NOGUEIRA *et al.*, 2019; PIEGZA; SZURA; ŁABA, 2021; RIBEIRO; GUERRA; SARUBBO, 2020). A afinidade intrínseca dos microrganismos por interfaces e sua habilidade de sintetizar compostos tensoativos, levam à formação de comunidades microbianas estruturadas chamadas biofilmes (MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021). A primeira e crucial etapa na formação de biofilmes é a adesão de bactérias em superfícies tanto vivas como não vivas. Esse processo é um fenômeno natural que ocorre em muitas bactérias, e é desencadeado em resposta a diversos estímulos ambientais, resultando na produção de uma matriz polimérica extracelular (ADNAN *et al.*, 2021).

Os biossurfactantes toleram amplas faixas de temperatura e pH, possuem propriedades emulsificantes e são biocompatíveis devido à sua baixa toxicidade (ARAÚJO; SILVA; TEIXEIRA, 2021). Estes compostos apresentam vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, pois podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis e exibem uma maior capacidade de biodegradação. Além disso, possuem uma maior especificidade em condições extremas, uma menor atividade interfacial e superficial, uma menor toxicidade, uma maior biocompatibilidade e uma maior compatibilidade ambiental (D'ALMEIDA *et al.*, 2024; MISHRA *et al.*, 2021; ROCHA *et al.*, 2014).

Devido às suas excelentes propriedades físico-químicas e características, os biossurfactantes são bioprodutos interessantes com várias aplicações industriais. Por

exemplo, os surfactantes microbianos podem ser aplicados na recuperação avançada de petróleo, biorremediação e emulsificação (BANAT *et al.*, 2014; SANTOS, 2019; SUN *et al.*, 2019).

No processo de biorremediação, os biossurfactantes leva à redução da tensão superficial do ambiente aquoso, onde os contaminantes hidrofóbicos estão presentes, e forma estruturas semelhantes a micelas que aprisionam os contaminantes hidrofóbicos e os tornam disponíveis ou solúveis na fase aquosa, tornando esses compostos mais facilmente disponível para os microrganismos (BORAH; SEN; PAKSHIRAJAN, 2021). De maneira similar, a decomposição biológica realizada pela comunidade microbiana nativa representa um dos mecanismos relevantes pelos quais substâncias hidrofóbicas contaminantes podem ser removidas ou reduzidas do meio ambiente (JIMOH; LIN, 2019).

Os biossurfactantes são comumente classificados independentemente de suas contrapartes químicas, levando em consideração o peso molecular (baixo ou alto), a concentração micelar crítica (CMC), o microrganismo produtor e seu modo de ação (KUMAR *et al.*, 2021). Os surfactantes de baixo peso molecular demonstram alta eficiência na redução da tensão superficial e interfacial (MOUTINHO *et al.*, 2021). Os biossurfactantes de alta massa molar apresentam maior eficácia na estabilização de emulsões de óleo em água (INÈS *et al.*, 2023).

Os quatro principais tipos de biossurfactantes são: (1) glicolipídios como ramnolipídios, trehalolipídios, lipídios manosileritritol e lipídios celobiose, (2) fosfolipídios como lecitina e lisolecitina, (3) lipoproteínas ou lipopeptídeos como surfactina, fengicina, iturina, liquenisina e kurstakin (4) surfactantes poliméricos como emulsan, lipomanan, alasan e liposan (ALI *et al.*, 2022; CZINKÓCZKY; NÉMETH, 2020; GÜRKÖK; ÖZDAL, 2021; HEALY; DEVINE; MURPHY, 1996; INÈS; DHOUHA, 2015). Os biossurfactantes glicolipídios são compostos anfifílicos naturais que têm despertado interesse recente devido à sua biodegradabilidade, diversidade e bioatividade (SHU *et al.*, 2021). Os lipopeptídeos e biossurfactantes de lipoproteínas são predominantemente produzidos por fungos, bactérias e leveduras. Essas biomoléculas desempenham um papel crucial em diversas aplicações industriais e ambientais. Em termos científicos, os lipopeptídeos e biossurfactantes de lipoproteínas têm a capacidade de aumentar a mobilidade em sistemas líquidos, reduzir a viscosidade, facilitar a solubilização de compostos insolúveis e atuar como agentes sequestrantes de metais (ANTONIOLI JÚNIOR *et al.*, 2022; PORTAL D'ALMEIDA *et al.*, 2023).

Além dos biossurfactantes, temos os bioemulsificantes, no qual o gênero *Acinetobacter* é amplamente reconhecido por sua capacidade de produzir um bioemulsificante altamente eficiente. Esse fato pode ser atribuído ao seu notável alto índice de hidrofobicidade da cepa (RIZZO *et al.*, 2021). Emulsan, biodispersan e alasan são exemplos destacados de biossurfactantes produzidos por diversas cepas de *Acinetobacter* (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019). No tópico 5.1, será fornecida mais detalhes sobre o gênero em estudo nesta pesquisa.

4.1 Biossurfactantes Produzidos por Bactérias do Gênero *Acinetobacter*

Bactérias do gênero *Acinetobacter* são Gram-negativas e são frequentemente isoladas do solo e da água (DARBY *et al.*, 2023). Algumas cepas de *Acinetobacter* possuem uma cápsula polissacarídica, a qual geralmente é um indicador de alta virulência. A presença de uma cápsula espessa, composta por polissacarídeos e polipeptídios, confere proteção às bactérias contra a fagocitose pelo sistema imunológico da célula hospedeira (PODUCH; KOTRA, 2007). Diversas pesquisas têm documentado a identificação e análise de diferentes espécies de *Acinetobacter* com habilidade de produzir biossurfactantes provenientes de diversas fontes, tais como solos contaminados por petróleo, águas residuais e outros ambientes com alta concentração de hidrocarbonetos (ZOBAER *et al.*, 2023).

As cepas de *Acinetobacter* demonstram a capacidade de degradar diversos tipos de contaminantes de hidrocarbonetos, incluindo petróleo bruto, n-alcanos, hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), benzeno e pireno. As cepas de *Acinetobacter venetianus* têm demonstrado habilidade na degradação do óleo diesel, sendo propostas como um sistema modelo para estudar o mecanismo de degradação de alcanos, além de serem consideradas uma plataforma promissora para a biorremediação da poluição causada pelo óleo (LIU; CALLIES, 2019). É relevante ressaltar que algumas espécies de *Acinetobacter* também apresentam potencial como agentes de biocontrole, possuindo propriedades anticancerígenas, antimicrobianas e a capacidade de inibir a formação de biofilmes (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019).

Representantes não patogênicos do gênero *Acinetobacter* têm a capacidade de sintetizar compostos de alto valor, como bioemulsificantes, biossurfactantes de moléculas pequenas (agentes ativos de superfície), enzimas e giberelinas. O primeiro produto de alto valor produzido por bactérias do gênero *Acinetobacter* foi o “Emulsan”

(PIROG; LUTSAI; MUCHNYK, 2021). O “Emulsan” é produzido por diferentes espécies de *Acinetobacter*, como *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, *Acinetobacter radioresistens* KA53, *Acinetobacter junii* BB1A e *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 (DONG *et al.*, 2016).

Além das mencionadas anteriormente, também há *Acinetobacter venetianus*, cuja avaliação constante na produção de biossurfactantes é fundamental. Isso é essencial para garantir a qualidade, eficácia e sustentabilidade dos produtos, atendendo às demandas ambientais e industriais em constante evolução.

Além disso, o avanço contínuo da pesquisa e desenvolvimento na área de biotecnologia traz consigo novos conhecimentos e técnicas. Estas inovações podem ser aplicadas para melhorar a eficiência da produção de biossurfactantes, tornando o processo mais econômico e ambientalmente responsável. A avaliação contínua da cepa de *Acinetobacter venetianus* na produção de biossurfactantes é vital para manter-se atualizado com as mais recentes descobertas, tecnologias e abordagens na produção de biossurfactantes.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Reagentes

Na condução deste trabalho, utilizou-se diferentes reagentes de grau analítico adquiridos da Cequímica, Neon, Kasvi e Dinâmica na comercialização de produtos químicos, sendo os principais a glicose ($C_6H_{12}O_6$), sulfato de amônio $((NH_4)_2SO_4)$, fosfato de sódio bibásico (NaH_2PO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), extrato de levedura, sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), o cloreto de sódio ($NaCl$), o hexano (C_6H_{14}), sulfato de sódio (Na_2SO_4), ágar e triptona. Também foi utilizado óleo diesel S-10 adquirido em um posto de combustíveis localizado na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil.

5.2 Microrganismo

A cepa *Acinetobacter venetianus* AMO1502 foi isolada de uma amostra de óleo coletada na praia de Amontada - Ceará, Brasil ($3^{\circ}01'25''$ S, $39^{\circ}38'17''$ W), área impactada pelo derramamento de óleo ocorrido em 2019. Este microrganismo foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. A sua sequência de RN 16S encontra-se depositada no Genbank com o seguinte número de acesso: MT478042.1. *A. venetianus* AMO1502 foi mantido em meio ATGE composto por 15 g L^{-1} ágar, 5 g L^{-1} triptona, 1 g L^{-1} glicose, $2,5\text{ g L}^{-1}$ extrato de levedura e $30,0\text{ g L}^{-1}$ NaCl a pH 7 e uma temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e foi cultivada a um novo meio mensalmente.

5.3 Propagação e Cultura do Inóculo em Meio de Produção

O meio de cultura utilizado para a obtenção do inóculo foi o meio mineral (MM) composto por: $10,0\text{ g L}^{-1}$ glicose, $1,0\text{ g L}^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$, $6,0\text{ g L}^{-1}$ $Na_4HPO_4 \cdot 7H_2O$, $3,0\text{ g L}^{-1}$ KH_2PO_4 , $5,0\text{ g L}^{-1}$ extrato de levedura, e $0,6\text{ g L}^{-1}$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a pH $7 \pm 0,3$ (D'ALMEIDA et al., 2023). A esterilização do meio foi realizada em autoclave a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Para a preparação do inóculo, três colônias de *A. venetianus* AMO1502 foram

adicionadas em 50 mL de meio mineral e incubadas a 30 °C e 150 rpm em agitador rotativo por 24 h.

5.4 Ensaios de Biodegradação e Produção de Biossurfactantes

A biodegradação do óleo diesel foi investigada juntamente com a produção de compostos de superfície ativa, variando a concentração desta fonte de hidrocarboneto. É importante observar que o diesel S-10 contém 12% de biodiesel em sua composição e apresenta um teor máximo de enxofre de 10 mg/kg.

Após a preparação do inóculo, 1% (v/v) do inóculo foi adicionado a 50 mL de meio mineral contendo diferentes concentrações de óleo diesel (0,5%, 1%, 1,5% e 2% (v/v)) não esterilizado como fonte de carbono. Onde foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio mineral. Ensaios de degradação do óleo diesel e produção de tensoativos foram realizados nas mesmas condições de preparo do inóculo com temperatura de 30 °C em agitação de 150 rpm por um período de 7 dias (168 h).

Nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 144 e 168 horas, foi avaliada a concentração celular, a adesão celular ao óleo diesel, a degradação do óleo diesel e a produção de compostos de superfície ativa foram mensurados. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A produção de compostos ativos de superfície foi acompanhada utilizando os métodos de contagem de células viáveis, a hidrofobicidade da superfície celular, o índice de emulsificação ($IE_{24\%}$) e a tensão superficial, sendo as metodologias descritas no Tópico 6.5.

5.5 Influência do pH

Na melhor condição obtida de degradação do óleo diesel, foi realizado um ensaio para avaliar a influência do pH na formação do composto de superfície ativa, variando o pH do meio (5, 6, 7, 8), utilizando uma solução de NaOH ($3,0 \text{ g L}^{-1}$) ou HCl ($3,0 \text{ g L}^{-1}$), acompanhando o $IE_{24\%}$ nos intervalos de tempo (0, 24, 48 e 72 horas) com os ensaios realizados em duplicata.

5.6 Métodos Analíticos

5.6.1 Crescimento Celular

O crescimento celular foi mensurado utilizando a metodologia de contagem de células viáveis em placa. Inicialmente foi transferido com uma pipeta estéril 100 µl da suspensão da cultura de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 para 900 µl de solução salina a 0,85% (m/v) estéril (diluição 1×10^{-2}). A suspensão foi agitada em vórtex e assepticamente foi transferida para 100 µl de solução salina 0,85% (m/v), sendo repetido este procedimento até obter uma diluição 1×10^{-6} .

Após, 50 µl da suspensão foi plaqueada em meio ATGE e foi realizado o espalhamento da cultura sobre a superfície do meio de cultura. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas. Após a incubação, foi realizado a contagem de colônias em cada placa, utilizando um contador de colônias, sendo selecionadas as placas que continham entre 30 e 300 colônias para se calcular a concentração média de células de microrganismos. A concentração é determinada multiplicando-se o número médio de colônias pelo inverso da diluição da placa de contagem.

5.6.2 Hidrofobicidade da Superfície Celular

A aderência celular aos componentes hidrofóbicos foi calculada com base na metodologia de Ali Khan *et al.*, (2017). Células de *A. venetianus* AMO1502 foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 5000 *g* em uma temperatura de 4 °C por 35 minutos e após foram lavadas duas vezes com água destilada. O pellet foi ressuspenso em meio mineral estéril e a densidade óptica a 600 nm (OD_{600}) foi ajustada para 0,5 para cada 1,5 mL de suspensão bacteriana lavada. Após a padronização, 200 µL de óleo diesel foram adicionados às suspensões de células lavadas e agitadas em alta velocidade por 3 min, logo em seguida, a densidade óptica a 600 nm (OD_{600}) foi medida novamente. Então, o índice de hidrofobicidade foi calculado de acordo com a Equação 01.

$$IH\% = \left[1 - \frac{OD_a}{OD_i} \right] \times 100 \quad (01)$$

Sendo IH% - Índice de hidrofobicidade; OD_a – densidade óptica inicial da suspensão celular (sem adição de diesel) e OD_i – densidade óptica da suspensão agitada (com adição de diesel).

5.6.3 Índice de Emulsificação (IE₂₄%)

Para determinação da atividade emulsificante, adaptou-se a metodologia descrita por Bal *et al.*, (1995), em que a atividade emulsificante foi analisada pela formação de emulsão utilizando 2 mL de óleo diesel ou querosene como fonte hidrofóbicas e 2 mL da suspensão celular ou do meio de cultura livre de células. A mistura foi agitada em vórtex por 2 min e após 24 h, o índice de emulsificação (IE₂₄%) foi calculado pela razão entre a altura da fase emulsificada e a altura total, conforme apresentado na Equação 02, sendo a altura da emulsão representada por H_{EP} e a altura da fase total por H_T.

$$IE_{24}(\%) = \frac{H_{EP}}{H_T} \times 100 \quad (02)$$

5.6.4 Tensão Superficial

A tensão superficial (TS) foi medida pelo método do anel Du Nouy usando um tensiômetro K6 Krüss. Cada análise foi realizada com 20 mL de meio livre de células. As medições das tensões superficiais foram feitas a 25 °C e repetidas três vezes para cada amostra. Com os valores da tensão superficial, determinou-se a redução da tensão superficial (RTS%) em relação a condição inicial do meio livre de células usando a Equação 3, que considera a diferença entre a tensão superficial inicial (TS_i), a tensão superficial final (TS_f) do sistema e a razão pela tensão absoluta inicial.

$$RTS (\%) = \frac{TS_i - TS_f}{TS_i} \times 100 \quad (03)$$

Sendo RTS% = Redução da tensão superficial; TS_i = Tensão superficial inicial do sistema; TS_f = Tensão superficial final do sistema.

5.6.5 Extração do Óleo Diesel e Análise de Cromatografia Gasosa

Para a análise da degradação de hidrocarbonetos presente no óleo diesel após 168 horas de cultivo, os hidrocarbonetos residuais foram inicialmente extraídos com uma solução de hexano 2:1 (hexano:meio), sob agitação em um agitador orbital a 200 rpm por 30 minutos. A seguir, a fase orgânica foi separada usando um funil de separação e a umidade foi removida adicionando sulfato de sódio a 20% (m/v) e filtrando-se a mistura. O solvente foi evaporado em um balão de fundo redondo conectado a um evaporador rotativo, sendo recuperado para extrações futuras. O extrato residual de hidrocarbonetos foi então transferido para vials e analisado por cromatografia gasosa.

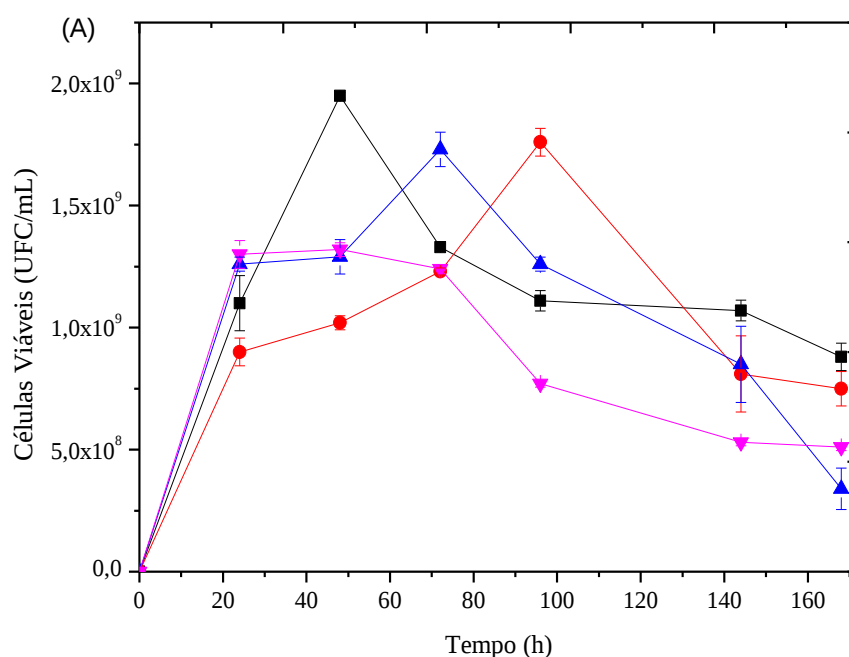
As análises foram realizadas no cromatógrafo gasoso GC – TCD - FID (Shimadzu, Japão) equipado com autosampler de modelo AOC-20i e uma coluna SLB-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Nitrogênio (N₂) foi utilizado como gás de arraste. A temperatura de injeção foi de 280 °C. A temperatura inicial da coluna foi ajustada em 40 °C. A taxa de degradação do diesel foi calculada usando a Equação 04 que considera a diferença entre a área absoluta no tempo zero (A_i) e a área absoluta final (A_f) pela razão entre área absoluta inicial

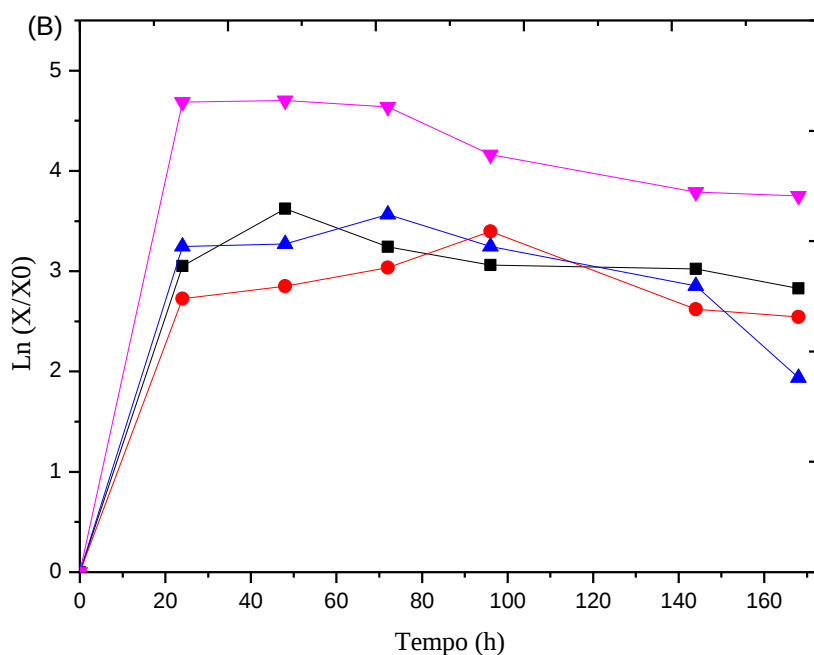
$$D (\%) = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100 \quad (04)$$

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das formas de observar a degradação de um hidrocarboneto por uma espécie microbiana é o acompanhamento do crescimento celular na fonte avaliada. No contexto desta pesquisa, o crescimento da cepa *A. venetianus* AMO1502 foi acompanhado nos experimentos de degradação do óleo diesel, e os resultados estão apresentados na Figura 12. A afinidade da cepa por componentes hidrofóbicos como n-alcanos é um tema de grande interesse na literatura, sendo uma característica essencial para a biorremediação de compostos derivados do petróleo (METROPOLITANA *et al.*, 2017; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; P. CHAMANROCH *et al.*, 2008).

Figura 12 – (A) Acompanhamento do crescimento celular e (B) curva logarítmica de crescimento da bactéria *A. venetianus* AMO1502 utilizando o óleo diesel como fonte de carbono nas concentrações de (■) 0,5%, (●) 1%, (▲) 1,5% e (▼) 2% (v/v) nos bioprocessos conduzidos a 30 °C e 150 rpm.





A cepa *A. venetianus* AMO1502 cresceu em meio mineral (MM) contendo apenas óleo diesel como fonte de carbono (Figura 12A), indicando que foi capaz de degradar o óleo diesel. A fase exponencial teve início às 24 horas, podendo ser observada na Figura 12B, com um maior crescimento celular de $1,95 \times 10^9$ UFC/mL alcançado em 48 horas usando 0,5% (v/v) de óleo diesel (Figura 12A). Após este período, observou-se uma diminuição no crescimento celular, provavelmente associada à toxicidade da fonte de carbono ou a seu esgotamento, resultando na morte celular devido às condições desfavoráveis ao crescimento.

Em outras concentrações, como 1% (v/v) de óleo diesel, foi observado o início da fase exponencial de crescimento em 24 horas (Figura 12B). No bioprocessamento usando 1% (v/v) o óleo diesel foi obtido em 72 h um crescimento celular de $1,23 \times 10^9$ UFC/mL, sendo que em 96 horas foi observado o maior crescimento celular, atingindo $1,76 \times 10^9$ UFC/mL, seguido por uma redução no crescimento celular após esse período (Figura 12A). Nos ensaios usando a concentração de 1,5% (v/v) de óleo diesel, a bactéria apresentou seu maior crescimento em 72 horas, atingindo $1,79 \times 10^9$ UFC/mL. Após esse período, é observada uma redução no crescimento celular devido ao acúmulo de produtos tóxicos resultantes do metabolismo do óleo diesel. O comportamento de crescimento celular foi semelhante aos estudos da caracterização de novas cepas degradadoras de óleo

diesel por *Acinetobacter venetianus* VE-C3 ao observar seu maior tamanho populacional no terceiro dia, contabilizando 72 horas do bioprocesso (PEPI *et al.*, 2003).

É importante destacar que o diesel utilizado neste estudo é o S-10 e sua composição é formada por cadeias de carbono de n-C₁₀ a n-C₂₁. Porém, sabe-se que o diesel disponível nos postos de combustíveis possui um percentual de 12% (v/v) de biodiesel no ano de 2023 segundo o Art. 2º da Resolução nº 3, de 20 de março de 2023, do CONSELHO NACIONAL DE POLÍTICA ENERGÉTICA - CNPE, influenciando sua composição devido à presença de cadeias de ácidos graxos, onde podem ser encontradas cadeias de carbono maiores que n-C₂₄, e um teor máximo de enxofre de 10 mg/kg (PYDIMALLA *et al.*, 2023). Alguns microrganismos oxidam preferencialmente hidrocarbonetos de cadeias curtas, tendo uma maior afinidade ou capacidade para metabolizar e utilizar como fonte de carbono os hidrocarbonetos com menor número de átomos de carbono na cadeia, embora existam algumas exceções de microrganismos que metabolizam preferencialmente alcanos de cadeia mais longa (C₂₀₊) (FLOYD *et al.*, 2022).

Para Luckarift *et al.*, (2011) ao avaliar a biodegradação de hidrocarbonetos de cadeia média por *Acinetobacter venetianus* constatou a habilidade da estirpe em utilizar hidrocarbonetos alifáticos de cadeia média como substrato de carbono evidencia sua relevância no contexto da biodegradação de compostos derivados de petróleo, especialmente em relação a matrizes complexas como o petróleo cru.

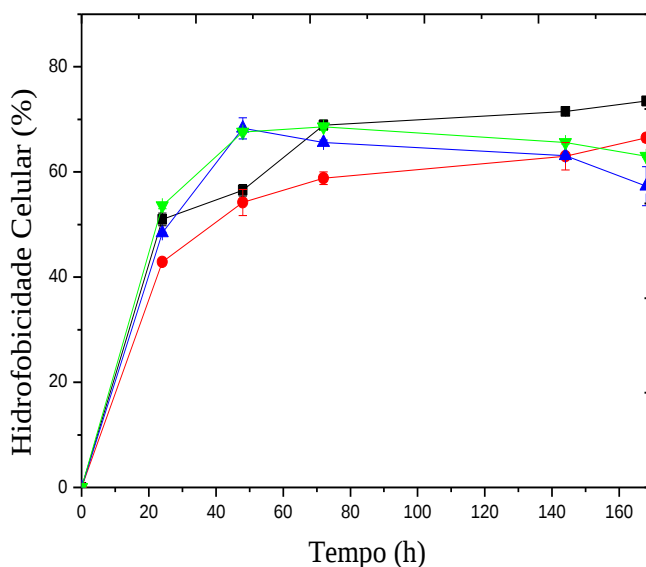
Mara *et al.*, (2012) constatou que dezessete cepas de *Acinetobacter* apresentaram um desempenho de crescimento superior em relação aos n-alcanos de cadeia longa (C₂₀) em comparação às moléculas de C₁₄ e C₁₀. Notavelmente, várias cepas de *Acinetobacter* não manifestaram utilização dos n-alcanos com extensão de C₁₀. Essa observação ressalta a variabilidade no repertório metabólico entre as cepas, possivelmente decorrente de adaptações evolutivas específicas a ambientes particulares.

Na concentração de 2% v/v de óleo diesel, *A. venetianus* AMO1502 apresentou a menor taxa de crescimento celular, comparadas com as demais concentrações. O maior crescimento foi observado na fase exponencial (48 h), obtendo 1,95x10⁹ UFC/mL, que pode ser explicado pelo fato da maior aderência do microrganismo a essa fonte de carbono (Figura 13), com isso, dificultando o metabolismo celular e a excreção de compostos que possam auxiliar na degradação dos compostos presentes no óleo diesel. Então, foi possível comparar o crescimento celular da bactéria ao seu índice de hidrofobicidade, apresentando seu maior nível em 48 h no bioprocesso

usando 2% (v/v) óleo diesel como demonstrado na Figura 13. Após este período, foi observada uma diminuição na densidade celular, indicando que as células tiveram que aumentar a degradação de hidrocarbonetos recalcitrantes provenientes do óleo diesel. Isso evidencia a capacidade do gênero *Acinetobacter venetianus* de utilizar exclusivamente n-alcanos como fonte de carbono e degradar hidrocarbonetos, conforme descrito na literatura (DI CELLO *et al.*, 1997; FONDI *et al.*, 2013a; LIU *et al.*, 2022).

Portanto, foi observado comportamento diferente do crescimento celular da cepa de *A. venetianus* AMO1502 nas concentrações avaliadas (0,5%, 1%, 1,5% e 2% (v/v)) de óleo diesel. Essas variações no crescimento celular podem ser atribuídas à mudança no mecanismo de captação com aumento da concentração do substrato ou efeito inibitório em doses mais elevadas (GUPTA *et al.*, 2020).

Figura 13 - Índices de hidrofobicidade celular de *A. venetianus* AMO1502 nos bioprocessos a 30 °C e 150 rpm utilizando diferentes concentrações de óleo diesel: (■) 0,5%, (●) 1%, (▲) 1,5% e (▼) 2% (v/v).



O índice de hidrofobicidade em todas as concentrações de óleo diesel avaliadas foram altos, obtendo valores de $73,5 \pm 0,9\%$, $66,5 \pm 0,8\%$, $57,3 \pm 3,7$ e $63 \pm 0,1\%$ em 168 h de processo utilizando 0,5%, 1%, 1,5% e 2% (v/v) de óleo diesel, respectivamente. Altos índices de hidrofobicidade também foram relatados por Mara *et al.*, (2012) para cinco cepas de *A. venetianus* (RAG-1^T, VE-C3, SI-2, CUHK 7025 e T4, MBIC 1332) usando óleo diesel.

Para Krasowska e Sigler, (2014), a hidrofobicidade da superfície celular (CSH) é fundamental para a ligação ou desprendimento das superfícies, com impactos significativos na adesão de microrganismos a superfícies bióticas e abióticas. Essa característica tem implicações tanto positivas quanto negativas em diversos campos, como na medicina, na indústria de biorremediação e na fermentação. Microrganismos hidrofóbicos podem causar danos a superfícies ao formar biofilmes; contudo, eles também são capazes de se acumular facilmente em poluentes orgânicos e degradá-los (ACHINAS; CHARALAMPOGIANNIS; EUVERINK, 2019; NISHAD FATHIMA; RAGHAVA RAO; UNNI NAIR, 2014).

Desta forma a elevada hidrofobicidade da superfície celular desempenha um papel crucial ao facilitar a aderência dos microrganismos às pequenas gotículas de hidrocarbonetos, seja na superfície celular ou nas próprias células (KRASOWSKA; SIGLER, 2014). Essa característica hidrofóbica pode favorecer a migração dos microrganismos do meio aquoso para a fase orgânica dos hidrocarbonetos. Uma vez nessa fase, a ação sinérgica de biossurfactantes e enzimas assume um papel fundamental ao promover a decomposição eficiente dos resíduos de hidrocarbonetos. No entanto, também, altos níveis de hidrofobicidade pode dificultar a difusão de compostos para o meio de cultura que são importantes para o metabolismo celular (AL-AZZAM; ALAZZAM, 2022).

Em relação aos surfactantes, estes compostos ativam a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por meio de dois mecanismos distintos. Primeiramente, eles podem solubilizar eficientemente os hidrocarbonetos, facilitando a separação do poluente das partículas do solo e da água aumentando as oportunidades de contato entre microrganismos (LING *et al.*, 2023). Além disso, os surfactantes também podem modificar a hidrofobicidade das superfícies das células microbianas (LING *et al.*, 2023). Com base nos estudos conduzidas por e Mehdi e Giti, (2008), que estabeleceram uma correlação entre a hidrofobicidade celular de diversas cepas bacterianas e sua habilidade de produção de biossurfactantes, emergiu a constatação de que bactérias caracterizadas por uma maior hidrofobicidade celular exibiram uma capacidade ampliada na geração de biossurfactantes, resultando em uma intensificação da eficácia degradação de petróleo bruto. Assim, nossos estudos mostraram que as concentrações de 0,5% e 1% (v/v) de óleo diesel, que apresentaram os maiores valores de hidrofobicidade, também resultaram em uma acentuada degradação dos compostos presentes no óleo diesel, conseguindo degradar 100% de todas as cadeias carbônicas.

Para Liu *et al.* (2004), a elevada hidrofobicidade apresentada pelos microrganismos frequentemente está correlacionada à existência de estruturas fibrilares na superfície celular, bem como à presença de proteínas específicas na parede celular. As fibrilas têm a capacidade de se fixar à superfície dos receptores. As proteínas encontradas na parede celular desempenham um papel de dupla natureza. Em um dos cenários, as proteínas com regiões hidrofóbicas expostas estabelecem uma ligação direta com as proteínas presentes na matriz extracelular. Em uma abordagem alternativa, a hidrofobicidade evidenciada na superfície celular pode favorecer as ligações, tornando mais eficientes e sustentando as interações específicas entre o receptor e o ligante (LIU *et al.*, 2004).

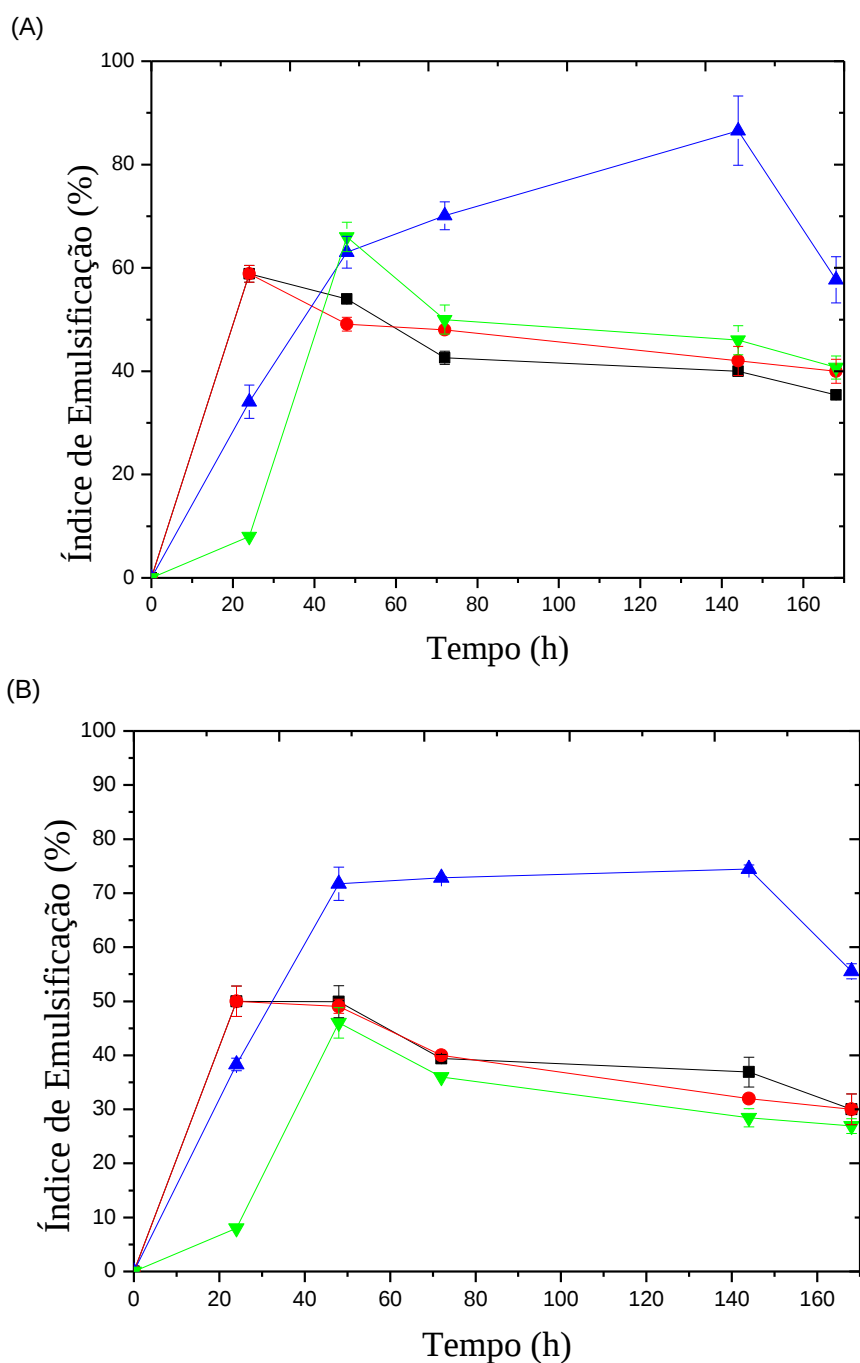
O comportamento hidrofóbico das células *A. venetianus* AMO1502, observado na Figura 13 é característico de microrganismos do gênero *Acinetobacter*, que formam uma cápsula polissacarídica em seu exterior que aumenta sua aderência a fontes de carbono lipossolúveis, como o óleo diesel. Esse comportamento ocorre durante a produção de bioemulsificantes poliméricos que fazem parte da rota metabólica da célula, permitindo a degradação de hidrocarbonetos (MERCALDI *et al.*, 2008). A membrana externa das células de *Acinetobacter venetianus* possui uma composição única que contribui para sua natureza hidrofóbica. Com um arranjo complexo de lipídios, proteínas e polissacarídeos, a membrana externa atua como uma barreira contra a penetração de água e influencia a hidrofobicidade geral da superfície celular (ABBASNEZHAD; GRAY; FOGHT, 2011). Esse fato indica que as células estão aderindo ao óleo diesel como estratégia de metabolização.

A importância dos polissacarídeos presentes na superfície celular transcende em diversos aspectos fundamentais para a biologia celular, incluindo a colonização eficaz de substratos, a aderência celular a superfícies apropriadas e a mitigação dos efeitos prejudiciais da dessecação (BARBE, 2004). As cápsulas polissacarídicas também conhecidas como exopolissacarídeos quando incorporado como constituinte do complexo da parede celular podem conferir tanto estabilidade estrutural quanto mecanismos de salvaguarda à célula bacteriana (KAUR; DEY, 2023). O exopolissacarídeo de natureza capsular emerge como o elemento proeminente que desempenha um papel essencial na promoção da adesão bacteriana a superfícies, muitas vezes culminando na geração predominante de biofilmes (KAUR; DEY, 2023). Esses exopolissacarídeos são produzidos por certos microrganismos, como *A. venetianus*, e têm sido associados a altos níveis de adesão, como observado em nossos estudos, podendo ser características

distintivas da formação de biofilme. Ao descrever a adesão bacteriana, simplesmente é descrito um ou mais estágios de desenvolvimento do biofilme, negligenciando o fato de que a população pode não atingir a maturidade Garrett *et al.*, (2008), sendo uma possível explicação para o menor crescimento celular nos bioprocessos conduzidos usando 2% (v/v) de óleo diesel, em que um maior índice de hidrofobicidade foi observado. Uma outra hipótese seria que a limitação da difusão do óleo diesel e do oxigênio dentro do biofilme inibe o crescimento (SIVADON; GRIMAUD, 2018).

Para explicar melhor os resultados obtidos de crescimento celular e índice de hidrofobicidade, monitorou-se a produção de compostos tensoativos pelo índice de emulsificação utilizando a suspensão celular e o meio livre de células. Nos ensaios em meio livre de células não houve formação de emulsão com nenhuma das fontes hidrofóbicas avaliadas, óleo diesel e querosene, provavelmente devido ao agente emulsificante não ter sido excretado no meio, confirmando a hipótese reportada nas explicações do crescimento celular e aderência das células ao óleo diesel ou ter uma concentração menor que a CMC. Porém, houve formação de emulsão nos ensaios utilizando suspensão celular usando as duas fontes hidrofóbicas (óleo diesel e querosene, Figuras 14A e 14B, respectivamente), devido à presença de bioemulsificantes ou biosurfactantes, que podem formar a interação entre moléculas hidrofílicas e lipofílicas, indicando a produção desses agentes por *A. venetianus* AMO1502 e que permaneceram aderidos às células.

Figura 14 - Atividade emulsificante (Índice de emulsificação, IE_{24}), utilizando (A) óleo diesel e (B) querosene como fonte hidrofóbica, da suspensão celular obtidas nos bioensaios a 30 °C e 150 rpm utilizando diferentes concentrações de óleo diesel: (■) 0,5%, (●) 1%, (▲) 1,5% e (▼) 2% (v/v).



Nos ensaios de formação de emulsão usando o óleo diesel como fonte hidrofóbica, há um aumento significativo na atividade emulsificante ($IE_{24}\%$) durante as primeiras horas do processo (até 48 h), analisando as suspensões celulares obtidas nos ensaios usando as concentrações de 0,5%, 1,0 % e 2% (v/v) de óleo diesel. No entanto,

na formação de emulsão usando a suspensão celular obtida na concentração de 1,5% (v/v) de óleo diesel, o IE₂₄% continua em ascensão até o período de 144 h, no qual apresenta o melhor IE₂₄%, após esta hora apresenta uma diminuição gradativa (Figura 14A), com comportamento semelhante para a suspensão celular usando 2% (v/v) de óleo diesel. Estes resultados podem ser explicados pela maior concentração de óleo diesel inibindo o crescimento da bactéria *A. venetianus* AMO1502, sendo necessário um maior tempo para o consumo desta fonte e a produção de metabólitos como, por exemplo, biossurfactantes ou bioemulsificantes.

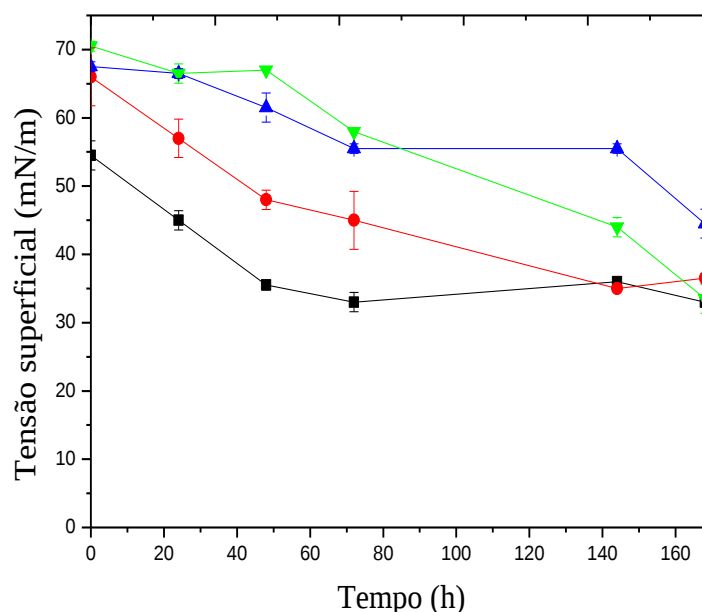
Nos ensaios utilizando querosene como fonte hidrofóbica (Figura 14B), o IE₂₄% apresentou uma redução gradual ao longo do tempo. A suspensão celular obtida no ensaio usando 1,5% (v/v) de óleo diesel apresentou o melhor IE₂₄%, alcançando o pico do IE₂₄% às 144 horas. Após esse período, iniciou-se um processo de diminuição que pode estar associada à liberação em baixas concentrações das células produtoras de biossurfactantes para o meio livre de células. Estes resultados indicam que a produção de compostos tensoativos por *A. venetianus* AMO1502 ocorreu predominantemente na fase de crescimento exponencial, fase que obteve o maior crescimento celular (vide Figura 12B).

Os índices de emulsificação (IE₂₄%) utilizando óleo diesel foram superiores aos EI₂₄% utilizando querosene como fonte hidrofóbica. Os bioemulsificantes produzidos por este gênero costumam ser mais eficientes na formação de emulsões entre água e hidrocarbonetos complexos, apresentando dificuldade de interação com cadeias menores (MUJUMDAR *et al.*, 2019). Este fato pode explicar a diferença, mesmo que pequena (aproximadamente 10%), entre o IE₂₄ obtido com o óleo diesel (C₁₀-C₂₁) e com o querosene (C₁₂-C₁₆). Este comportamento é semelhante ao relatado por Su *et al.* (2009) ao estudar cepas de *Acinetobacter*, um outro estudo realizado por PORTAL D'ALMEIDA *et al.*, (2023) relatou a produção de um bioemulsificante pela cepa *A. venetianus* AMO1502, utilizando glicose como fonte de carbono.

Também, acompanhou-se a tensão superficial do meio livre de células durante os bioprocessos e os resultados estão apresentados na Figura 15. As reduções da tensão superficial foram de $60,6 \pm 1\%$, $55,3 \pm 0,7\%$, $65,9 \pm 2\%$ e $50,4 \pm 2\%$, dos meios de células livres proveniente dos processos usando 0,5%, 1%, 1,5% e 2% (v/v) de óleo diesel, respectivamente, no tempo de 0 horas a 168 horas. Esses resultados indicam a formação de compostos ativos de superfície para o meio de cultura, mas com baixíssima

ação emulsificante, já que não foi possível formar emulsões usando o meio livre de células em nenhuma das fontes hidrofóbicas avaliadas (óleo diesel e querosene).

Figura 15 – Perfil da tensão superficial do meio livre de células obtido do cultivo de *A. venetianus* AMO1502 a 30 °C e 150 rpm utilizando diferentes concentrações de óleo diesel: (■) 0.5%, (●) 1%, (▲) 1,5% e (▼) 2% (v/v).



A monitorização da tensão superficial pode servir como um indicador valioso para avaliar a produção de biossurfactantes e otimizar os processos de cultivo microbiano visando a aplicação industrial e ambiental (GIRO *et al.*, 2009; SANTOS, 2013). Uma tensão superficial (TS) inferior a 40 mN/m costuma ser considerada um indicativo da síntese de biossurfactantes em um ambiente de cultivo microbiano Zhou *et al.*, (2020), isso foi possível constatar nos resultados.

A diminuição da tensão superficial por parte dos biossurfactantes promove a facilitação da interação entre microrganismos, como o *Acinetobacter*, e o ambiente circundante, bem como o acesso aos nutrientes essenciais para sua sobrevivência e crescimento. Esse processo é possível devido à capacidade intrínseca dos biossurfactantes de alterar as propriedades físico-químicas das interfaces entre diferentes fases. Para Mujumdar; Joshi; Karve, (2019) a característica preeminente inerente ao biossurfactante reside na sua habilidade de diminuir a tensão superficial. Uma cepa de *Acinetobacter* também foi testada por estes autores, apresentando redução semelhantes reportado no

presente estudo, obtendo uma tensão superficial de 35 mN/m e 45 mN/m utilizando hexadecano e glicose como fonte de carbono (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019).

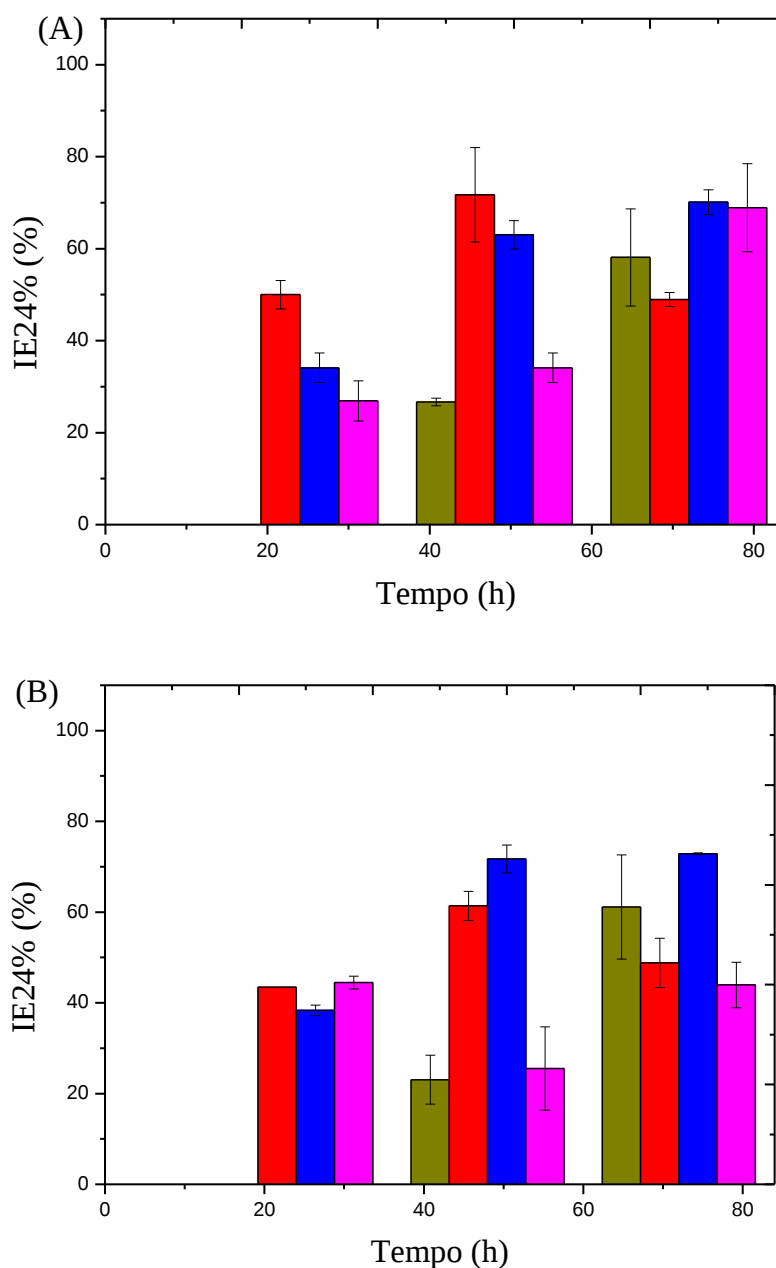
Em outros estudos realizados por uma linhagem de 2SA do gênero de *Acinetobacter* cultivada em meio Bushnell-Hass (BH), ao qual foi adicional 1% (v/v) de óleo diesel como uma única fonte de carbono e energia, foi observado após um período de 7 dias, uma tensão superficial de 33 mN/m do meio de cultura (DIALLO *et al.*, 2021). Os dados de referência corroboram com os resultados obtidos neste estudo.

Como os maiores índices de emulsificação foram alcançados usando a suspensão celular obtida no ensaio usando 1,5% (v/v) de óleo diesel, investigou-se a influência do pH na condição cultivo por ação na formação de emulsão. O índice de emulsificação usando as fontes hidrofóbicas óleo diesel e querosene podem ser observados nas Figuras 16A e 16B, respectivamente.

Os resultados indicaram que *Acinetobacter venetianus* AMO1502 apresentou melhor desempenho de crescimento em pHs 6, 7 e 8. No ensaio usando a suspensão celular obtida com 4 horas no ensaio a pH 6, foram obtidos os maiores índices de emulsificação, 71% e 68% utilizando óleo diesel e querosene como fonte hidrofóbica, respectivamente. No bioprocessamento conduzido a pH 7, os maiores índices de emulsificação foram de 70% e 72% em 72 horas utilizando óleo diesel e querosene como fonte hidrofóbica, respectivamente. Já em pH 8 os maiores índices de emulsão foram observados em 72 horas com 61% e 43% utilizando óleo diesel e querosene, respectivamente. Os menores índices foram obtidos usando a suspensão celular do bioprocessamento a pH 5,0, demonstrando um baixo crescimento celular da cepa avaliada em pH ácidos. Este resultado pode ser explicado pela ação enzimática, em que a biodegradação de hidrocarbonetos, tanto alifáticos quanto aromáticos, ocorrem pela ação de enzimas que atuam em pHs mais neutros a alcalinos e estas enzimas dependem das condições de oxigênio presente no meio. Em condições aeróbicas, enzimas oxigenases introduzem átomos de oxigênio nos hidrocarbonetos (as mono-oxigenases adicionam um átomo de oxigênio a um substrato, enquanto as dioxigenases adicionam dois).

Os resultados obtidos neste estudo são consistentes com os resultados reportados por outros autores, cujas pesquisas demonstraram que as cepas do gênero *Acinetobacter* apresentam condições favoráveis de crescimento em pH neutro a alcalino (BAO *et al.*, 2014; NTSHINGILA; JIMOH; LIN, 2022; PORTAL D'ALMEIDA *et al.*, 2023).

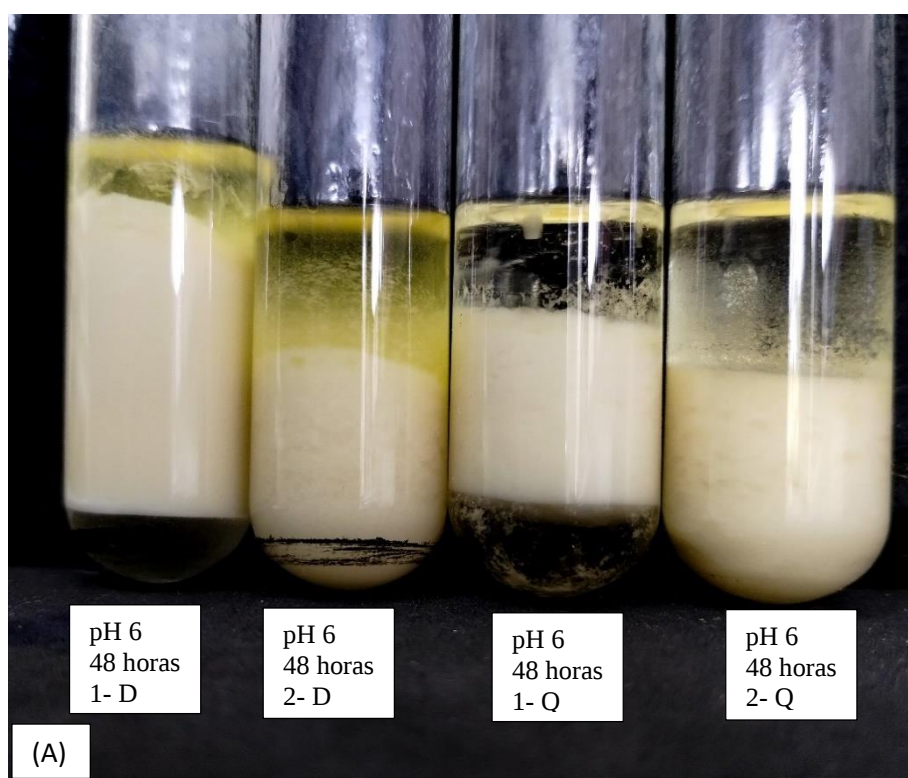
Figura 16 – Índices de Emulsificações (IE_{24}) mensurados usando as suspensões celulares obtidas nos bioprocessos a 30 °C e 150 rpm, utilizando 1,5% (v/v) de óleo diesel a diferentes pH (5 (■), 6 (■), 7 (■) e 8 (■)) e usando as fontes hidrofóbicas (A) óleo diesel e (B) querosene.

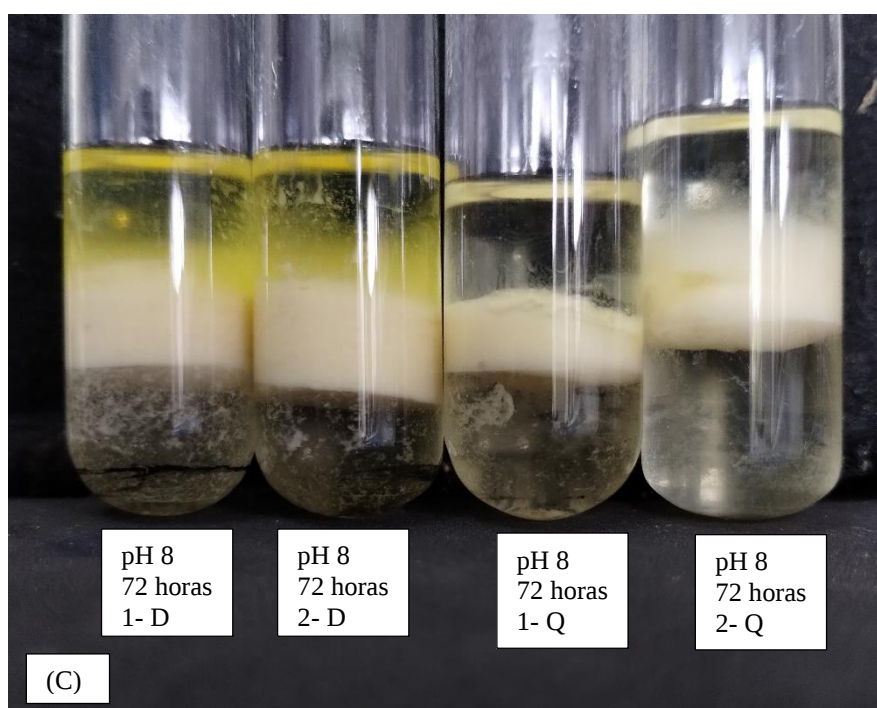
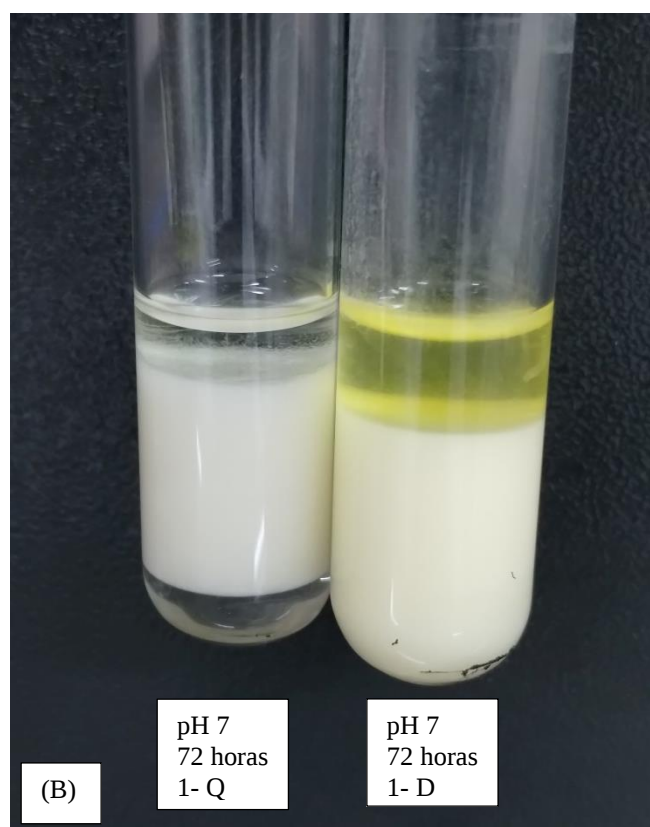


As emulsões resultantes da suspensão celular com uma concentração de 1,5% (v/v) de óleo diesel são apresentadas na Figura 17 e são acompanhadas ao longo da variação do pH. Inicialmente, na Figura 17A, é ilustrada a formação de emulsões em pH 6 após 48 horas, utilizando óleo diesel e querosene. É possível observar as fases das emulsões e a fase em que ambas as fontes hidrofóbicas foram utilizadas, podendo ser encontradas tanto na parte superior quanto, em algumas situações, na inferior.

Aparentemente, nessas condições de pH, as emulsões estão estáveis, porém, em algumas regiões, é perceptível a dispersão de gotículas da emulsão na área onde o óleo diesel e o querosene estão presentes. Na Figura 17B, é perceptível a formação de emulsões em pH 7 após 72 horas, onde se destaca uma maior estabilidade em comparação com o pH 6. As fases estão mais claramente divididas e não há turbidez nas regiões onde as fontes hidrofóbicas foram utilizadas, resultando em uma aparência mais homogênea e um aspecto geral mais favorável do que nas condições de pH anteriores. Além disso, observa-se um aumento na eficiência de emulsificação ($IE_{24\%}$) nessa condição. Na Figura 17C, são apresentadas as emulsões formadas em pH 8 após 72 horas, onde se observa os menores valores de $IE_{24\%}$. Nessa condição, é evidente uma faixa de emulsões reduzida e uma dispersão significativa nas áreas onde o óleo diesel e o querosene estão presentes.

Figura 17 – Imagens das emulsões formuladas com a suspensão celular obtida a (A) pH 6 em 48 horas; a (B) pH 7 em 72 horas e (C) pH 8 em 72 horas, utilizando óleo diesel (D) e querosene (Q) como fonte hidrofóbica.

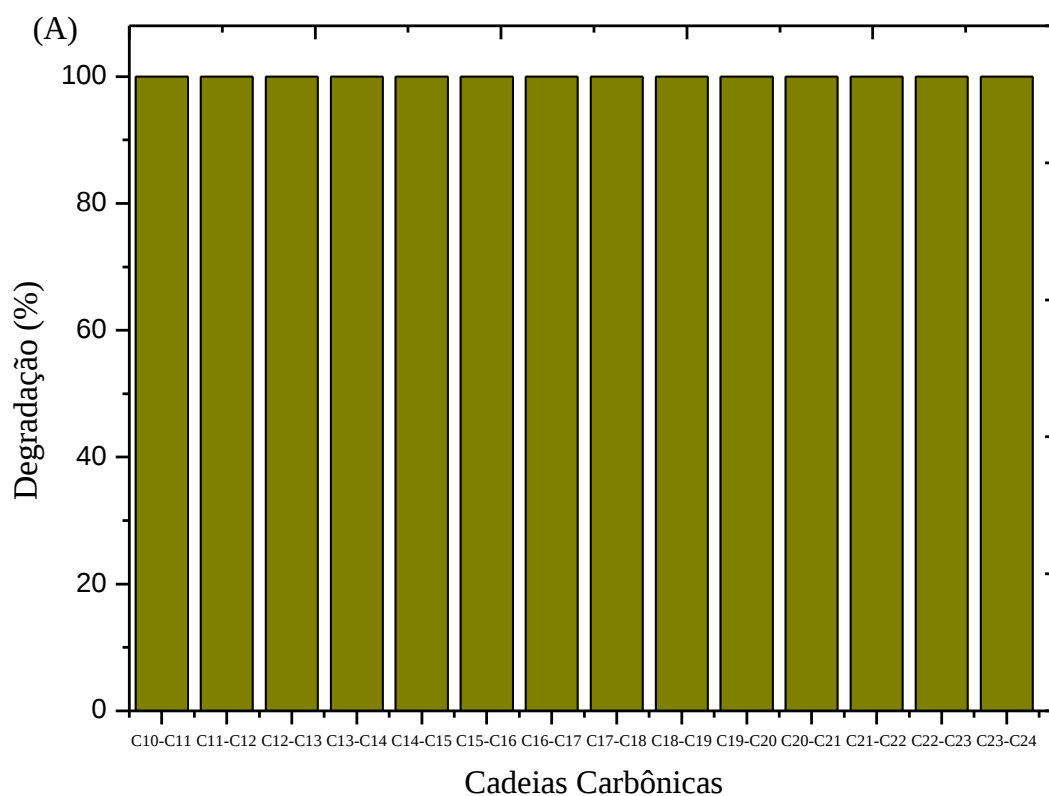


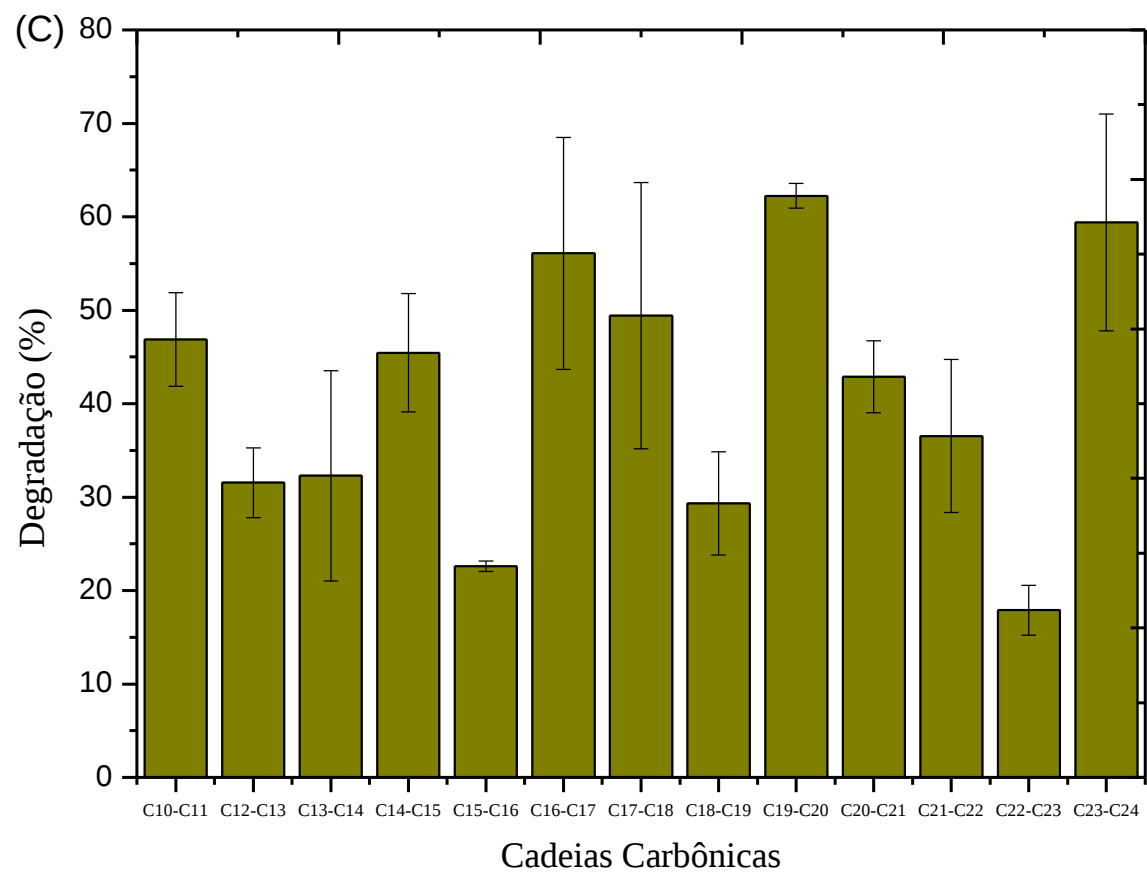
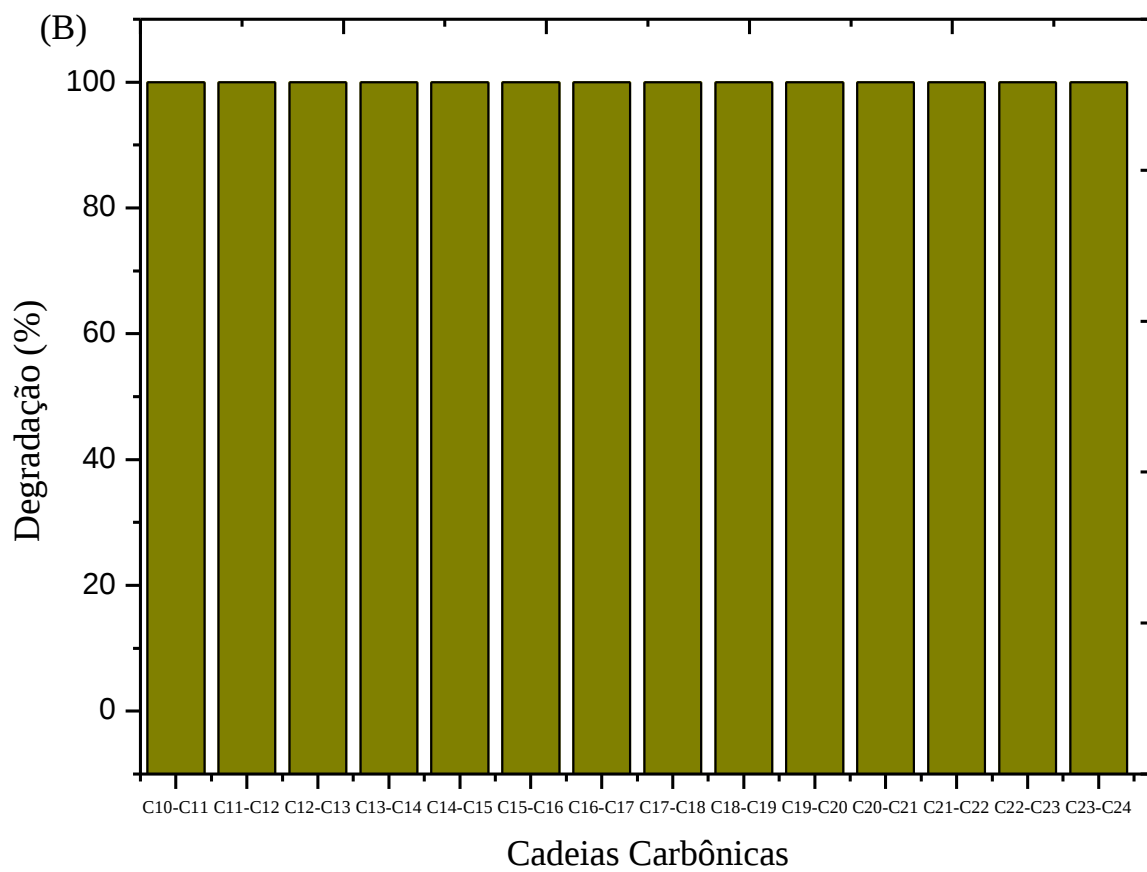


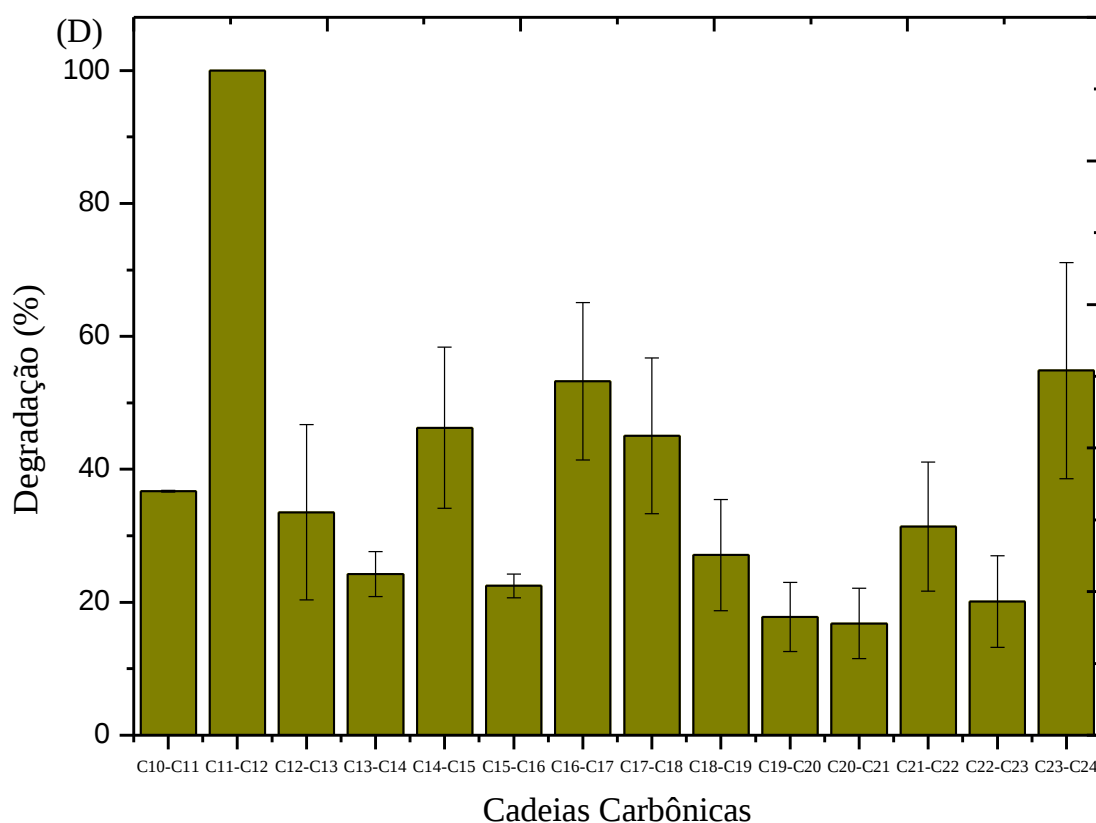
O óleo diesel foi analisado, revelando em sua estrutura uma variedade de cadeias carbônicas que se estendem do C_8 - C_{22} . Notavelmente, observou-se uma maior concentração de hidrocarbonetos em cadeias entre C_{19} - C_{22} , conforme documentado no

Apêndice A. Em seguida, foi analisada a degradação do óleo diesel em concentrações de 0,5%, 1%, 1,5% e 2% (v/v). Na análise das áreas dos compostos identificados nos cromatogramas obtidos revelaram que em todos os ensaios ocorreu degradação do óleo diesel (nas concentrações avaliadas neste estudo) pela bactéria *A. venetianus* AMO1502 (Figura 18).

Figura 18 - Porcentagem de degradação dos compostos presentes no óleo diesel após 168 horas do processo de biodegradação por *Acinetobacter venetianus* AMO1502 conduzidos a 30 °C e 150 rpm com diferentes concentrações deste derivado do petróleo. (A) 0,5%, (B) 1%, (C) 1,5%, (D) 2% (v/v) de óleo diesel.







A cepa de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 demonstrou uma notável capacidade de degradar hidrocarbonetos, podendo ser observada uma degradação de 100% dos compostos presentes no óleo diesel nas concentrações avaliadas de 0,5% e 1% (v/v) de óleo diesel após 168 horas, conforme apresentado nas Figuras 18 (A) e (B), respectivamente. Além disso, outros estudos também demonstraram a capacidade de outras cepa de *Acinetobacter* degradar óleo diesel (CHEN *et al.*, 2016; HO *et al.*, 2020; LEE; WOO; TEN, 2012).

Já nos processos conduzidos usando 1,5% (v/v) de óleo diesel, observou-se uma degradação mais acentuada nos compostos com cadeias carbônicas entre C₁₇-C₁₈, C₁₉-C₂₀ e C₂₃-C₂₄, alcançando uma degradação de 56% ± 12, 62% ± 1 e 59% ± 11 respectivamente (Figura 18C). Para a concentração de 2% (v/v) de óleo diesel (Figura 18D), foi possível verificar uma degradação de 100% nas cadeias de C₁₁-C₁₂, nas cadeias de C₁₆-C₁₇ foi possível observar uma degradação acentuada de 52% ± 11, já nas cadeias de C₂₃-C₂₄ foi constatado uma degradação de 54% ± 16.

Após as análises, constatou-se uma maior porcentagem de biodegradação do óleo diesel nas concentrações de 0,5% e 1% (v/v) em comparação com as concentrações de 1,5% e 2% (v/v). Isso pode ocorrer porque, em concentrações iniciais mais altas, o

óleo diesel pode cobrir a superfície da água, impedindo a dissolução do oxigênio no meio líquido e inibindo o crescimento celular, podendo ser visto sua inibição na análise de crescimento celular e na sua baixa produção de bioemulsificante realizada com a concentração 2% (v/v) de óleo diesel. Sabe-se que as condições aeróbicas são essenciais para a degradação de hidrocarbonetos petrolíferos no ambiente, pois as principais vias de degradação de compostos saturados e aromáticos envolvem oxigenases e oxigênio molecular (LEE; WOO; TEN, 2012; LUO *et al.*, 2013).

Em nossos estudos, o óleo diesel que utilizamos, e que sofreu degradação, é composto por n-alcenos e sua degradação por bactérias aeróbicas como *Acinetobacter venetianus* foi descrita por WENTZEL *et al.*, (2007), no qual as proteínas do tipo AlkB atuam em conjunto com duas moléculas de transferência de elétrons, uma rubredoxina de ferro dinuclear e uma rubredoxina redutase de ferro mononuclear, direcionando elétrons do NADH para o centro ativo do alceno hidroxilase (AlkM). Após a oxidação inicial do n-alceno, o álcool correspondente é então oxidado pelas enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase para formar o aldeído e o ácido carboxílico correspondente, respectivamente. O ácido carboxílico então atua como substrato para a acil-CoA sintetase, e o acil-CoA produzido entra na via da β -oxidação.

Na literatura, há estudos que exploram a via metabólica do gênero *Acinetobacter venetianus*, evidenciando seu considerável potencial na degradação de hidrocarbonetos, como óleo diesel, com cadeias de C₁₀-C₂₂, através de enzimas da família AlkB (CHEN *et al.*, 2016; FONDI *et al.*, 2013; FRANCIS PRASHANTH *et al.*, 2021; KOTHARI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2021). Este gênero é comumente encontrado em vários ambientes contaminados por hidrocarbonetos, como solos, sedimentos de manguezais, sedimentos marinhos nas antárticas e ambientes intocados, evidenciando seu potencial para a biodegradação de alcenos JUNG; PARK, (2015), sendo importante ressaltar que a cepa avaliada neste estudo foi isolada do derramamento de petróleo que ocorreu na Costa Brasileira em 2019 que continha hidrocarboneto aromático policíclico (PAHs) de baixo peso molecular, particularmente naftalenos (parentais e alquilados), fenantreno, pireno, fluoranteno) e altas concentrações de hidrocarbonetos de cadeia média e longa (IBAMA, 2020; MAGALHÃES *et al.*, 2022; NOBRE *et al.*, 2022).

7 CONCLUSÃO

O microrganismo *Acinetobacter venetianus* AMO1502, isolado de um derramamento de óleo na costa brasileira, demonstrou ser capaz de degradar totalmente o óleo diesel nas concentrações 0,5%, 1% (v/v) e parcialmente nas concentrações 1,5% e 2% (v/v), com uma alta adesão das células a esta fonte. Durante este processo, a bactéria produziu um agente emulsificante aderido as células e excretou para o meio de cultivo um agente surfactante capaz de reduzir a tensão superficial do meio em até 47,9%. O agente emulsificante foi mais eficiente usando óleo diesel como fonte hidrofóbica, por apresentar compostos com cadeia maior que a outra fonte avaliada, querosene.

Os resultados obtidos ressaltam o potencial aplicativo da cepa isolada em processos de biorremediação e degradação do óleo diesel, visando mitigar os riscos e consequências causadas por derramamentos deste derivado do petróleo, caracterizado, também, por um processo menos agressivo e mais sustentável.

REFERÊNCIAS

ABBASNEZHAD, H.; GRAY, M.; FOGHT, J. M. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 4, p. 653–675, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3589-4>

ABOELKHAIR, H.; DIAZ, P.; ATTIA, A. Biosurfactant production using Egyptian oil fields indigenous bacteria for microbial enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 208, p. 109601, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2021.109601>

ACHINAS, S.; CHARALAMPOGIANNIS, N.; EUVERINK, G. J. W. A Brief Recap of Microbial Adhesion and Biofilms. **Applied Sciences**, v. 9, n. 14, p. 2801, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app9142801>

ADIPAH, S. Introduction of Petroleum Hydrocarbons Contaminants and its Human Effects. **Journal of Environmental Science and Public Health**, v. 03, n. 01, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.26502/jesph.96120043>

ADNAN, M. *et al.* Functional and Structural Characterization of *Pediococcus pentosaceus*-Derived Biosurfactant and Its Biomedical Potential against Bacterial Adhesion, Quorum Sensing, and Biofilm Formation. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1371, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111371>

AHMED, F.; FAKHRUDDIN, A. N. M.; FAKHRUDDIN, A. A Review on Environmental Contamination of Petroleum Hydrocarbons and its Biodegradation. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.19080/IJESNR.2018.11.555811>

ALAMGIR, K.; SAHA, S. Integrated Bacterial-Microalgal Consortium for the Efficient Removal of Organic Pollutants from Water Bodies-A review. **Industrial Engineering Journal**, v. 52, 2023. Disponível em: http://www.journal-iiie-india.com/1_may_23/124_online.pdf. Acesso em: 27 set. 2023.

AL-AZZAM, N.; ALAZZAM, A. Micropatterning of cells via adjusting surface wettability using plasma treatment and graphene oxide deposition. **PLOS ONE**, v. 17, n. 6, p. e0269914, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269914>

ALI KHAN, A. H.; TANVEER, S.; ALIA, S.; ANEES, M.; SULTAN, A.; IQBAL, M.; YOUSAF, S. Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. **Ecological Engineering**, v. 104, p. 158–164, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.04.023>

ALI, N.; PANG, Z.; WANG, F.; XU, B.; EL-SEEDI, H. R. Lipopeptide Biosurfactants from *Bacillus* spp.: Types, Production, Biological Activities, and Applications in Food. **Journal of Food Quality**, v. 2022, p. 1–19, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/3930112>

ALORI, E. T.; GABASAWA, A. I.; ELENWO, C. E.; AGBEYEGBE, O. O.

Bioremediation techniques as affected by limiting factors in soil environment. **Frontiers in Soil Science**, v. 2, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.937186>

AMEEN, F.; MOSLEM, M.; HADI, S.; AL-SABRI, A. E. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 211–218, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.005>

ANFILATOV, A. A.; CHUVASHEV, A. N. Impact of methanol use in a diesel engine on workflow performance. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 862, n. 6, p. 062069, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/862/6/062069>

ANP. **Refino de petróleo**. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural>. Acesso em: 31 jan. 2024.

ANSARI, F.; MOMINA; AHMAD, A.; RAFATULLAH, M. Review on bioremediation technologies of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil: Mechanisms and future perspective. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 179, p. 105582, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2023.105582>

ANTONIOLI JÚNIOR, R.; POLONI, J. de F.; PINTO, É. S. M.; DORN, M. Interdisciplinary Overview of Lipopeptide and Protein-Containing Biosurfactants. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 76, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes14010076>

ARAÚJO, L. S. S.; SILVA, S. Q.; TEIXEIRA, M. C. Developing a biosurfactant to attenuate arsenic contamination in mining tailings. **Heliyon**, v. 7, n. 2, p. e06093, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06093>

ASNADI, C.; MARNO, S.; LESTARI, P.; ISLAMI, D.; PUTRI, N.; RUSTYAWAN, W. THE PRODUCTION AND SPECIFICATION ANALYSIS OF AVIATION BIOFUEL AS THE ALTERNATIVE FUEL OF AIRPLANE. **Ecological Engineering and Environment Protection**, p. 50–57, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.32006/eeep.2020.1.5057>

AYDIN, S. Comprehensive analysis of combustion, performance and emissions of power generator diesel engine fueled with different source of biodiesel blends. **Energy**, v. 205, p. 118074, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.118074>

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 180, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>

BALA, S.; GARG, D.; THIRUMALESH, B. V.; SHARMA, M.; SRIDHAR, K.; INBARAJ, B. S.; TRIPATHI, M. Recent Strategies for Bioremediation of Emerging Pollutants: A Review for a Green and Sustainable Environment. **Toxics**, v. 10, n. 8, p. 484, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxics10080484>

BANAT, I. M.; SATPUTE, S. K.; CAMEOTRA, S. S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactantsTM production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>

BAO, M.; PI, Y.; WANG, L.; SUN, P.; LI, Y.; CAO, L. Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter* sp. D3-2 and its biodegradation of crude oil. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v. 16, n. 4, p. 897–903, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C3EM00600J>

BARBE, V. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 19, p. 5766–5779, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh910>

BARBOSA, F.; RIBEAUX, D.; ROCHA, T.; COSTA, R.; GUZMÁN, R.; MARCELINO, P.; LACERDA, T.; DA SILVA, S. Biosurfactants: Sustainable and Versatile Molecules. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220074>

BARSTON, T. **Série de Seminários TPR - Parte Três: Queima In-Situ**. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://www.oilspillresponse.com/pt-br/hub-de-conhecimento/resposta/serie-de-seminarios-tpr---parte-tres-queima-in-situ/>. Acesso em: 7 fev. 2024.

BEN. **BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2023. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-748/topico-687/BEN2023.pdf>. Acesso em: 6 fev. 2024.

BHATT, P.; CHEN, S.; MURPHY, C. Editorial: Recent advancements in microbe-pesticide interaction: a smart-soil bioremediation approach. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1206179>

BIANCO, F.; RACE, M.; PAPIRIO, S.; ESPOSITO, G. A critical review of the remediation of PAH-polluted marine sediments: current knowledge and future perspectives. **Resources, Environment and Sustainability**, v. 11, p. 100101, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2022.100101>

BORAH, S. N.; SEN, S.; PAKSHIRAJAN, K. Biosurfactants for Enhanced Bioavailability of Micronutrients in Soil. In: **Biosurfactants for a Sustainable Future**. [S. l.]: Wiley, 2021. p. 159–181. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119671022.ch8>

CHAUDHARY, D. K.; BAJAGAIN, R.; JEONG, S.-W.; KIM, J. Insights into the biodegradation of diesel oil and changes in bacterial communities in diesel-contaminated soil as a consequence of various soil amendments. **Chemosphere**, v. 285, p. 131416, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131416>

CHEN, Y.; YU, B.; LIN, J.; NAIDU, R.; CHEN, Z. Simultaneous adsorption and

biodegradation (SAB) of diesel oil using immobilized *Acinetobacter venetianus* on porous material. **Chemical Engineering Journal**, v. 289, p. 463–470, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.01.010>

CHILVERS, B. L.; MORGAN, K. J.; WHITE, B. J. Sources and reporting of oil spills and impacts on wildlife 1970–2018. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 1, p. 754–762, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10538-0>

CHUAH, L. F.; CHEW, K. W.; BOKHARI, A.; MUBASHIR, M.; SHOW, P. L. Biodegradation of crude oil in seawater by using a consortium of symbiotic bacteria. **Environmental Research**, v. 213, p. 113721, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113721>

CIPEK, M.; PAVKOVIĆ, D.; KRZNAR, M.; KLJAIĆ, Z.; MLINARIĆ, T. J. Comparative analysis of conventional diesel-electric and hypothetical battery-electric heavy haul locomotive operation in terms of fuel savings and emissions reduction potentials. **Energy**, v. 232, p. 121097, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.121097>

CONSELHO NACIONAL DE POLÍTICA ENERGÉTICA - CNPE. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/conselhos-e-comites/cnpe/resolucoes-do-cnpe/2023/ResCNPE32023.pdf>. Acesso em: 25 maio. 2024.

COSTA, C.; SANTOS, N.; DOS ANJOS, R. AVALIAÇÃO DE RISCO DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS A PARTIR DOS POSTOS DE COMBUSTÍVEIS. **Revista Eletrônica Científica Ensino Interdisciplinar**, v. 9, n. 29, p. 222–240, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.21920/recei72023929222240>

CRISTOREAN, C.; MICLE, V.; SUR, I. M.; SUR, I. M. **A critical analysis of ex-situ bioremediation technologies of hydrocarbon polluted soils**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: www.ecoterra-online.ro.

CZINKÓCZKY, R.; NÉMETH, Á. The Effect of pH on Biosurfactant Production by *Bacillus Subtilis* DSM10. **Hungarian Journal of Industry and Chemistry**, v. 48, n. 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.33927/hjic-2020-25>

D'ALMEIDA, A. P.; DE AZEVEDO, D. C. S.; MELO, V. M. M.; DE ALBUQUERQUE, T. L.; ROCHA, M. V. P. Bioemulsifier production by *Acinetobacter venetianus* AMO1502: Potential for bioremediation and environmentally friendly applications. **Marine Pollution Bulletin**, v. 203, p. 116436, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116436>

DARBY, E. M.; BAVRO, V. N.; DUNN, S.; MCNALLY, A.; BLAIR, J. M. A. RND pumps across the genus *Acinetobacter*: AdeIJK is the universal efflux pump. **Microbial Genomics**, v. 9, n. 3, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000964>

DASH, D. M.; OSBORNE, W. J. A systematic review on the implementation of advanced and evolutionary biotechnological tools for efficient bioremediation of organophosphorus pesticides. **Chemosphere**, v. 313, p. 137506, 2023. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137506>

DE AGUIAR PEDOTT, V.; MORAES, G. H.; SOARES, C.; PADOIN, N.; RIELLA, H. G.; JOSE DE ANDRADE, C. Biosurfactants as structure directing agents of porous siliceous materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 345, p. 112279, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2022.112279>

DELLA-FLORA, I. K.; DUPONT, G. K.; CLERICI, N. J.; SERAFINI, C. G.; HOFFMANN, J. I.; WELTER, N.; PORTA, P. G. D.; WEBER, P. F. UMA REVISÃO DAS TECNOLOGIAS DE BIOESTIMULAÇÃO ORGÂNICA DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO / A REVIEW OF ORGANIC BIOSTIMULATION TECHNOLOGIES FOR SOILS CONTAMINATED WITH OIL HYDROCARBONS. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 72256–72269, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n9-610>

DELMAS, I. V. M. Isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes/bioemulsificantes e degradadoras de petróleo de solos salinos. 2022. Disponível em: <https://pantheon.ufrj.br/handle/11422/20626>. Acesso em: 26 set. 2023.

DHAKA, A.; CHATTOPADHYAY, P. A review on physical remediation techniques for treatment of marine oil spills. **Journal of Environmental Management**, v. 288, p. 112428, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112428>

DI CELLO, F.; PEPI, M.; BALDI, F.; FANI, R. Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. **Research in Microbiology**, v. 148, n. 3, p. 237–249, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(97\)85244-8](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(97)85244-8)

DIALLO, M. M.; VURAL, C.; ŞAHAR, U.; OZDEMIR, G. Kurstakin molecules facilitate diesel oil assimilation by *Acinetobacter haemolyticus* strain 2SA through overexpression of alkane hydroxylase genes. **Environmental Technology**, v. 42, n. 13, p. 2031–2045, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1689301>

DONG, H.; XIA, W.; DONG, H.; SHE, Y.; ZHU, P.; LIANG, K.; ZHANG, Z.; LIANG, C.; SONG, Z.; SUN, S.; ZHANG, G. Rhamnolipids Produced by Indigenous *Acinetobacter junii* from Petroleum Reservoir and its Potential in Enhanced Oil Recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01710>

EQUIPAMENTO DE DERRAMAMENTO DE ÓLEO. In: ELASTEC., 2024. Disponível em: <https://www.elastec.com/pt/produtos/equipamento-de-derramamento-de-%C3%B3leo/>. Acesso em: 6 fev. 2024.

ERAS-MUÑOZ, E.; FARRÉ, A.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X.; GEA, T. Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. **Bioengineered**, v. 13, n. 5, p. 12365–12391, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621>

FLOYD, J. G.; STAMPS, B. W.; BOJANOWSKI, C. L.; GOODSON, W. J. The Composition of Diesel Fuel Influences the Structure of Microbiological Assemblages in Contaminated Storage Tanks 2 3. **BioRxiv**, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.1101/2022.02.09.479836>

FONDI, M. *et al.* The genome sequence of the hydrocarbon-degrading *Acinetobacter venetianus* VE-C3. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 5, p. 439–449, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.003>

FORGIARINI, A. M.; MARQUEZ, R.; SALAGER, J.-L. Formulation Improvements in the Applications of Surfactant–Oil–Water Systems Using the HLDN Approach with Extended Surfactant Structure. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3771, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26123771>

FRANCIS PRASHANTH, P.; SHRAVANI, B.; VINU, R.; M., L.; RAMESH PRABU, V. Production of diesel range hydrocarbons from crude oil sludge via microwave-assisted pyrolysis and catalytic upgradation. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 146, p. 383–395, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.08.025>

GABIÑA, G.; MARTIN, L.; BASURKO, O. C.; CLEMENTE, M.; ALDEKOA, S.; URIONDO, Z. Performance of marine diesel engine in propulsion mode with a waste oil-based alternative fuel. **Fuel**, v. 235, p. 259–268, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.07.113>

GAD, S. C. Diesel fuel. In: **Encyclopedia of Toxicology**. [S. l.]: Elsevier, 2024. p. 697–702. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00515-7>

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>

GAUR, V. K.; SHARMA, P.; SIROHI, R.; VARJANI, S.; TAHERZADEH, M. J.; CHANG, J.-S.; YONG NG, H.; WONG, J. W. C.; KIM, S.-H. Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: An overview. **Bioresource Technology**, v. 343, p. 126059, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126059>

GAYATHIRI, E.; PRAKASH, P.; KARMEGAM, N.; VARJANI, S.; AWASTHI, M. K.; RAVINDRAN, B. Biosurfactants: Potential and Eco-Friendly Material for Sustainable Agriculture and Environmental Safety—A Review. **Agronomy**, v. 12, n. 3, p. 662, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy12030662>

GIRO, M. E. A.; MARTINS, J. J. L.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 5, p. 738–747, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/biot.200800296>

GRANDELLE, R. **Vazamento de mais de 1 milhão de litros de óleo na Baía de Guanabara completa 20 anos**. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/brasil/vazamento-de-mais-de-1-milhao-de-litros-de-oleo-na-baia-de-guanabara-completa-20-anos-1-24198470>. Acesso em: 27 fev. 2024.

GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A. *Bacillus licheniformis*: The unexplored alternative for the anaerobic production of lipopeptide biosurfactants? **Biotechnology Advances**, v. 60, p. 108013, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108013>

GUPTA, B.; PURI, S.; THAKUR, I. S.; KAUR, J. Enhanced pyrene degradation by a biosurfactant producing *Acinetobacter baumannii* BJ5: Growth kinetics, toxicity and substrate inhibition studies. **Environmental Technology & Innovation**, v. 19, p. 100804, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100804>

GURKOK, S. Important parameters necessary in the bioreactor for the mass production of biosurfactants. In: **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science**. [S. l.]: Elsevier, 2021. p. 347–365. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823380-1.00020-4>

GÜRKÖK, S.; ÖZDAL, M. Microbial Biosurfactants: Properties, Types, and Production. **Anatolian Journal of Biology** 2 2 7–12. Disponível em: <https://dergipark.org.tr/en/pub/ajbiol/issue/67768/1048467>

HADIBARATA, T.; VOIJANT TANGAHU, B. Green engineering principles and application: bioremediation. **Environmental and Toxicology Management**, v. 1, n. 3, p. 1–8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33086/etm.v1i3.2504>

HEALY, M. G.; DEVINE, C. M.; MURPHY, R. Microbial production of biosurfactants. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 18, n. 1–4, p. 41–57, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0921-3449\(96\)01167-6](https://doi.org/10.1016/S0921-3449(96)01167-6)

HO, M. T.; LI, M. S. M.; MCDOWELL, T.; MACDONALD, J.; YUAN, Z.-C. Characterization and genomic analysis of a diesel-degrading bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* CA16, isolated from Canadian soil. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 39, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00632-z>

HU, G.; MOHAMMADIUN, S.; GHARAHBAGH, A. A.; LI, J.; HEWAGE, K.; SADIQ, R. Selection of oil spill response method in Arctic offshore waters: A fuzzy decision tree based framework. **Marine Pollution Bulletin**, v. 161, p. 111705, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111705>

IBAMA. **Relatório de Acidentes Ambientais 2020**. Brasília: [s. n.], 2020 a. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/relatorios/2022-02-08_Relatorio_de_Acidentes_Ambientais_2020_Ibama.pdf. Acesso em: 5 fev. 2024.

IBAMA. **RELATÓRIO TÉCNICO**. Brasília: [s. n.], 2020 . Disponível em: https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-protecao-ambiental/emergencias-ambientais/manchasdeoleo/arquivos/2022/2022-12-16_sei_ibama_6898984_relatorio_tecnico_ibama.pdf. Acesso em: 28 maio. 2024.

INÈS, M.; DHOUBA, G. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. **Carbohydrate Research**, v. 416, p. 59–69, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.07.016>

INÈS, M.; MOUNA, B.; MARWA, E.; DHOUBA, G. Biosurfactants as Emerging

Substitutes of Their Synthetic Counterpart in Detergent Formula: Efficiency and Environmental Friendly. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 31, n. 7, p. 2779–2791, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10924-023-02778-1>

IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 176–179, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb01035.x>

JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, p. 109607, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>

JOHANN, S.; GOSSEN, M.; MUELLER, L.; SELJA, V.; GUSTAVSON, K.; FRITT-RASMUSSEN, J.; WEGEBERG, S.; CIESIELSKI, T. M.; JENSSEN, B. M.; HOLLERT, H.; SEILER, T.-B. Comparative toxicity assessment of in situ burn residues to initial and dispersed heavy fuel oil using zebrafish embryos as test organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 13, p. 16198–16213, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11729-5>

JOHNSON, P.; TRYBALA, A.; STAROV, V.; PINFIELD, V. J. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 102340, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102340>

JUNG, J.; PARK, W. Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 6, p. 2533–2548, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6439-y>

KAUR, N.; DEY, P. Bacterial exopolysaccharides as emerging bioactive macromolecules: from fundamentals to applications. **Research in Microbiology**, v. 174, n. 4, p. 104024, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.104024>

KERAMEA, P.; SPANOUDAKI, K.; ZODIATIS, G.; GIKAS, G.; SYLAIOS, G. Oil Spill Modeling: A Critical Review on Current Trends, Perspectives, and Challenges. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 9, n. 2, p. 181, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jmse9020181>

KHALFALLAH, A. Structure and Applications of Surfactants. In: **Surfactants - Fundamental Concepts and Emerging Perspectives**. [S. l.]: IntechOpen, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.111401>

KLEINDIENST, S.; PAUL, J. H.; JOYE, S. B. Using dispersants after oil spills: impacts on the composition and activity of microbial communities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 388–396, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3452>

KORSHUNOVA, T. Yu.; CHETVERIKOV, S. P.; BAKAEVA, M. D.; KUZINA, E.

V.; RAFIKOVA, G. F.; CHETVERIKOVA, D. V.; LOGINOV, O. N. Microorganisms in the Elimination of Oil Pollution Consequences (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 344–354, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0003683819040094>

KOSHLAF, E.; S BALL, A. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. **AIMS Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 25–49, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.1.25>

KOTHARI, A.; CHARRIER, M.; WU, Y.-W.; MALFATTI, S.; ZHOU, C. E.; SINGER, S. W.; DUGAN, L.; MUKHOPADHYAY, A. Transcriptomic analysis of the highly efficient oil-degrading bacterium *Acinetobacter venetianus* RAG-1 reveals genes important in dodecane uptake and utilization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 20, p. fnw224, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw224>

KRASOWSKA, A.; SIGLER, K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112>

KUMAR, A. *et al.* Microbial Biosurfactant: A New Frontier for Sustainable Agriculture and Pharmaceutical Industries. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1472, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox10091472>

KUMARI, A.; KUMARI, S.; PRASAD, G. S.; PINNAKA, A. K. Production of Sophorolipid Biosurfactant by Insect Derived Novel Yeast *Metschnikowia churdharensis* f.a., sp. nov., and Its Antifungal Activity Against Plant and Human Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678668>

ŁAWNICZAK, Ł.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2327–2339, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4740-1>

LEE, M.; WOO, S.-G.; TEN, L. N. Characterization of novel diesel-degrading strains *Acinetobacter haemolyticus* MJ01 and *Acinetobacter johnsonii* MJ4 isolated from oil-contaminated soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2057–2067, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1008-3>

LEONARDO, R. S.; DWECK, J.; MURTA VALLE, M. L. **Evaluation of the volatility characteristics of diesel / biodiesel blends using thermal analysis techniques**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2019. Disponível em: <https://pdf.blucher.com.br/engineeringproceedings/simea2019/PAP117.pdf>. Acesso em: 6 fev. 2024.

LIN, C.; CHERUIYOT, N. K.; BUI, X.-T.; NGO, H. H. Composting and its application in bioremediation of organic contaminants. **Bioengineered**, v. 13, n. 1, p. 1073–1089, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2017624>

LING, H.; HOU, J.; DU, M.; ZHANG, Y.; LIU, W.; CHRISTIE, P.; LUO, Y. Surfactant-enhanced bioremediation of petroleum-contaminated soil and microbial

community response: A field study. **Chemosphere**, v. 322, p. 138225, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138225>

LIU, J.; CHEN, S.; ZHAO, B.; LI, G.; MA, T. A Novel FadL Homolog, AltL, Mediates Transport of Long-Chain Alkanes and Fatty Acids in *Acinetobacter venetianus* RAG-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 20, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.01294-22>

LIU, J.; ZHAO, B.; LAN, Y.; MA, T. Enhanced degradation of different crude oils by defined engineered consortia of *Acinetobacter venetianus* RAG-1 mutants based on their alkane metabolism. **Bioresource Technology**, v. 327, p. 124787, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124787>

LIU, Y.; YANG, S.-F.; TAY, J.-H.; LIU, Q.-S.; QIN, L.; LI, Y. Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 371–379, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.009>

LIU, Z.; CALLIES, U. Implications of using chemical dispersants to combat oil spills in the German Bight – Depiction by means of a Bayesian network. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 609–620, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.063>

LOOR URGILÉS, L. D. Análisis de los estudios de degradación de contaminantes orgánicos con énfasis en los surfactantes aniónicos de las aguas residuales mediante los procesos Electro-Fenton y Fotoelectrocatalisis. 2022. Disponível em: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/26609/1/UCE-FCQ-CQ-LOOR%20LUIS.pdf>. Acesso em: 11 maio. 2023.

LOPES, P. R. M.; CRUZ, V. H.; DE MENEZES, A. B.; GADANHOTO, B. P.; MOREIRA, B. R. de A.; MENDES, C. R.; MAZZEO, D. E. C.; DILARRI, G.; MONTAGNOLLI, R. N. Microbial bioremediation of pesticides in agricultural soils: an integrative review on natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 21, n. 4, p. 851–876, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11157-022-09637-w>

LUCKARIFT, H. R.; SIZEMORE, S. R.; FARRINGTON, K. E.; FULMER, P. A.; BIFFINGER, J. C.; NADEAU, L. J.; JOHNSON, G. R. Biodegradation of medium chain hydrocarbons by *Acinetobacter venetianus* 2AW immobilized to hair-based adsorbent mats. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 6, p. 1580–1587, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.701>

LUIZ, L.; NAVARRO, L.; SILVA, G. V.; CAULLIRAUX, H. M.; CAMEIRA, R. F. **Estruturação de mecanismos de coordenação para melhoria da gestão da confiabilidade: o caso de uma planta da indústria petroquímica.** [S. l.: s. n.].

LUO, Q.; ZHANG, J.-G.; SHEN, X.-R.; FAN, Z.-Q.; HE, Y.; HOU, D.-Y. Isolation and characterization of marine diesel oil-degrading *Acinetobacter* sp. strain Y2. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 633–640, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0513-9>

M. STAINSBY, F.; HODAR, J.; VAUGHAN, H. Biosurfactant Production by *Mycolic*

Acid-Containing Actinobacteria. In: **Actinobacteria - Diversity, Applications and Medical Aspects**. [S. l.]: IntechOpen, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.104576>

MACIEL, J. M. **Estudo comparativo da degradação de óleo diesel por culturas isoladas e em consórcio**. Recife: [s. n.], 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/27496>. Acesso em: 16 abr. 2024.

MADANI, M.; ZARGAR, G.; TAKASSI, M. A.; DARYASAFAR, A.; WOOD, D. A.; ZHANG, Z. Fundamental investigation of an environmentally-friendly surfactant agent for chemical enhanced oil recovery. **Fuel**, v. 238, p. 186–197, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.10.105>

MAGALHÃES, K. M.; CARREIRA, R. S.; ROSA FILHO, J. S.; ROCHA, P. P.; SANTANA, F. M.; YOGUI, G. T. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fishery resources affected by the 2019 oil spill in Brazil: Short-term environmental health and seafood safety. **Marine Pollution Bulletin**, v. 175, p. 113334, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113334>

MANGA, E. B.; CELIK, P. A.; CABUK, A.; BANAT, I. M. Biosurfactants: Opportunities for the development of a sustainable future. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 56, p. 101514, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101514>

MANSOURI, A.; CREGUT, M.; JOUANNEAU, S.; THOUAND, G.; DURAND, M.-J. Evaluation of Biomonitoring Strategies to Assess Performance of a Bioremediation Bioprocess. **Sustainability**, v. 14, n. 17, p. 10932, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su141710932>

MARA, K. *et al.* Molecular and phenotypic characterization of Acinetobacter strains able to degrade diesel fuel. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 3, p. 161–172, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.12.002>

MARKANDE, A. R.; PATEL, D.; VARJANI, S. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 124963, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124963>

MÁRQUEZ-ROCHA, F. J.; HERNÁNDEZ-RODRÍ, V.; LAMELA, Ma. T. Biodegradation of Diesel Oil in Soil by a Microbial Consortium. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 128, n. 3/4, p. 313–320, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1010392821353>

MARTINS, L. S.; MONTICELLI, F. M.; MULINARI, D. R. Influence of the granulometry and fiber content of palm residues on the diesel S-10 oil sorption in polyurethane /palm fiber biocomposites. **Results in Materials**, v. 8, p. 100143, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rinma.2020.100143>

MEHDI, H.; GITI, E. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 2, p. 170–178, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.004>

MERCALDI, M. P.; DAMS-KOZLOWSKA, H.; PANILAITIS, B.; JOYCE, A. P.; KAPLAN, D. L. Discovery of the Dual Polysaccharide Composition of Emulsan and the Isolation of the Emulsion Stabilizing Component. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 7, p. 1988–1996, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm800239p>

METROPOLITANA, U. A.; VAZQUEZ-VAZQUEZ, M.; ORTEGA-DE LA ROSA, J. L.; HUERTA-OCHO, N. D.; GIMENO, S.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; WHITAKER, S. NOVEL EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCED BY *Acinetobacter bouvetii* UAM25: PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND PAHs BIOEMULSIFYING CAPABILITY. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, p. 721–733, 2017. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62053304003>

MISHRA, S.; LIN, Z.; PANG, S.; ZHANG, Y.; BHATT, P.; CHEN, S. Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 418, p. 126253, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126253>

MNIF, I.; MNIF, S.; SAHNOUN, R.; MAKTOUF, S.; AYEDI, Y.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 19, p. 14852–14861, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4488-5>

MOLDES, A. B.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, L.; RINCÓN-FONTÁN, M.; LÓPEZ-PRIETO, A.; VECINO, X.; CRUZ, J. M. Synthetic and Bio-Derived Surfactants Versus Microbial Biosurfactants in the Cosmetic Industry: An Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2371, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22052371>

MORALES-GUZMÁN, G.; FERRERA-CERRATO, R.; RIVERA-CRUZ, M. del C.; TORRES-BUSTILLOS, L. G.; ARTEAGA-GARIBAY, R. I.; MENDOZA-LÓPEZ, Ma. R.; ESQUIVEL-COTE, R.; ALARCÓN, A. Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 127–134, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.003>

MOREIRA, L. M.; LYONB, J. P. Ionic and non-ionic surfactants: Micelles, reverse micelles and micro heterogenous systems. **Pubvet**, v. 16, n. 4, p. 1–6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n04a1083.1-6>

MOUTINHO, L. F.; MOURA, F. R.; SILVESTRE, R. C.; ROMÃO-DUMARESQ, A. S. Microbial biosurfactants: A broad analysis of properties, applications, biosynthesis, and techno-economical assessment of rhamnolipid production. **Biotechnology Progress**, v. 37, n. 2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.3093>

MUJUMDAR, S.; JOSHI, P.; KARVE, N. Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp.: A review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 277–287, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jobm.201800364>

NADIM, F.; HOAG, G. E.; LIU, S.; CARLEY, R. J.; ZACK, P. Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 26, n. 1–4, p. 169–178, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0920-4105\(00\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0920-4105(00)00031-0)

NAGTODE, V. S. *et al.* Green Surfactants (Biosurfactants): A Petroleum-Free Substitute for Sustainability—Comparison, Applications, Market, and Future Prospects. **ACS Omega**, v. 8, n. 13, p. 11674–11699, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00591>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Resumo do composto PubChem para CID 3423265, dodecilsulfato de sódio**. [s. l.], 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-dodecyl-sulfate>. Acesso em: 23 abr. 2024.

NETO, D. P.; JUNIOR, O. H. N.; GIANNINI, R. **Contenção: Contenção de derramamento de óleo em cenário offshore**. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.petroleoenergia.com.br/contencao-contencao-de-derramamento-de-oleo-em-cenario-offshore/#:~:text=Barreiras%20Absorventes%20%E2%80%93%20S%C3%A3o%20constitu%C3%ADdas%20por,e%20com%20as%20barreiras%20de>. Acesso em: 5 fev. 2024.

NISHAD FATHIMA, N.; RAGHAVA RAO, J.; UNNI NAIR, B. Effective Utilization of Solid Waste from Leather Industry. In: **The Role of Colloidal Systems in Environmental Protection**. [S. l.]: Elsevier, 2014. p. 593–613. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63283-8.00023-5>

NOBRE, P. *et al.* The 2019 northeast Brazil oil spill: scenarios. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. suppl 2, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-376520220210391>

NOGUEIRA FELIX, A. K.; MARTINS, J. J. L.; LIMA ALMEIDA, J. G.; GIRO, M. E. A.; CAVALCANTE, K. F.; MACIEL MELO, V. M.; LOIOLA PESSOA, O. D.; PONTE ROCHA, M. V.; ROCHA BARROS GONÇALVES, L.; SARAIVA DE SANTIAGO AGUIAR, R. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 256–263, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.062>

NTSHINGILA, N. P.; JIMOH, A. A.; LIN, J. Production and characterisation of a biosurfactant based on *Acinetobacter* sp. V2 and its potential use for environmental applications. **International Journal of Environmental Studies**, v. 79, n. 6, p. 1099–1122, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00207233.2021.1977535>

NWINYI, O. C.; KANU, I. A.; TUNDE, A.; AJANAKU, K. O. Characterization of diesel degrading bacterial species from contaminated tropical ecosystem. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 789–796, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402250>. Acesso em: 29 maio. 2024.

OILCHANGE INTERNATIONAL. **Equipes de resposta da Guarda Costeira “prejudicadas por produtos químicos usados para limpar o derramamento da BP”**. [s. l.], 2018. Disponível em: <https://priceofoil.org/2018/03/07/coast-guard-responders-harmed-by-chemicals-used-to-clean-up-bps-spill/>. Acesso em: 7 fev. 2024.

OKE, F. M.; NDIRIBE, C. C.; MUSA, S. I. Bioremediation of diesel polluted soils with *Eichhornia crassipes* (water hyacinth). **Notulae Scientia Biologicae**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15835/12410814>

P. CHAMANROCH; M. MAZAHARI ASSADI; A. NOOHI; S. YAHYAI. **Emulsan analysis produced by locally isolated bacteria and *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1**. [S. l.]: Stationery Office, 2008. v. 5. Disponível em: <https://ijehse.tums.ac.ir/index.php/jehse/article/view/156>

PANDE, V.; PANDEY, S. C.; SATI, D.; PANDE, V.; SAMANT, M. Bioremediation: an emerging effective approach towards environment restoration. **Environmental Sustainability**, v. 3, n. 1, p. 91–103, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00099-w>

PANDEY, P. K.; SUKHDHANE, K. S. Bioremediation of Aquatic Environment. In: **Advances in Fisheries Biotechnology**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2021. p. 423–439. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-16-3215-0_24

PASSOS, Á. C. P.; RODNISTZKY, G. M. ESTUDO DE TÉCNICAS DE DESCONTAMINAÇÃO POR BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO BRUTO . 2023. Disponível em: https://repositorio.ifes.edu.br/bitstream/handle/123456789/3675/TCC_ESTUDO_DE_T%c3%89CNICAS_DE_DESCONTAMINA%c3%87%c3%83O_POR_BIORREMEDIA%c3%87%c3%83O_DE_SOLOS_CONTAMINADOS_POR_PETR%c3%93LEO_BRUTO.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 27 set. 2023.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; ALBARICO, F. P. J. B.; PANDEY, A.; CHEN, C.-W.; DONG, C.-D. Organic wastes bioremediation and its changing prospects. **Science of The Total Environment**, v. 824, p. 153889, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153889>

PEIXOTO, R. S.; VERMELHO, A. B.; ROSADO, A. S. Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–7, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4061/2011/475193>

PENG, B.; YAO, Z.; WANG, X.; CROMBEEN, M.; SWEENEY, D. G.; TAM, K. C. Cellulose-based materials in wastewater treatment of petroleum industry. **Green Energy & Environment**, v. 5, n. 1, p. 37–49, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.09.003>

PEPI, M.; MINACCI, A.; DI CELLO, F.; BALDI, F.; FANI, R. Long-term analysis of diesel fuel consumption in a co-culture of *Acinetobacter venetianus*, *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes faecalis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 83, n. 1, p. 3–9, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1022930421705>

PÉREZ-DEL-OLMO, A.; RAGA, J. A.; KOSTADINOVA, A. Parasite communities in

a marine fish indicate ecological recovery from the impacts of the Prestige oil-spill 12–13 years after the disaster. **Science of The Total Environment**, v. 847, p. 157354, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157354>

PETE, A. J.; BHARTI, B.; BENTON, M. G. Nano-enhanced Bioremediation for Oil Spills: A Review. **ACS ES&T Engineering**, v. 1, n. 6, p. 928–946, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsestengg.0c00217>

PIAO, L.; PARK, C. J.; KIM, S.; PARK, K.; LEE, Y.; KIM, H.-Y.; MOON, M.-W.; PARK, H. Development of rapid and effective oil-spill response system integrated with oil collection, recovery and storage devices for small oil spills at initial stage: From lab-scale study to field-scale test. **Journal of Environmental Management**, v. 345, p. 118833, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118833>

PIEGZA, M.; SZURA, K.; ŁABA, W. Trichoderma citrinoviride: Anti-Fungal Biosurfactants Production Characteristics. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.778701>

PIROG, T. P.; LUTSAI, D. A.; MUCHNYK, F. V. Biotechnological Potential of the Acinetobacter Genus Bacteria. **Mikrobiolohichni Zhurnal**, v. 83, n. 3, p. 92–109, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.03.092>

PODUCH, E.; KOTRA, L. P. Acinetobacter Infections. In: **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. [S. l.]: Elsevier, 2007. p. 1–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60871-2>

PORTAL D'ALMEIDA, A.; DE ALBUQUERQUE, T. L.; MELO, V. M. M.; SILVEIRA VIEIRA, R.; PONTE ROCHA, M. V. Biosurfactant Production by *Acinetobacter venetianus* and Its Application in Bioremediation. **Chemical Engineering & Technology**, v. 46, n. 6, p. 1106–1114, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ceat.202200540>

PRINCE, R. C. A half century of oil spill dispersant development, deployment and lingering controversy. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 176, p. 105510, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2022.105510>

PYDIMALLA, M.; HUSAINI, S.; KADIRES, A.; KUMAR VERMA, R. Sustainable biodiesel: A comprehensive review on feedstock, production methods, applications, challenges and opportunities. **Materials Today: Proceedings**, v. 92, p. 458–464, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.03.593>

RAFFA, C. M.; CHIAMPO, F. Bioremediation of Agricultural Soils Polluted with Pesticides: A Review. **Bioengineering**, v. 8, n. 7, p. 92, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bioengineering8070092>

RAKLAMI, A.; MEDDICH, A.; OUFDU, K.; BASLAM, M. Plants—Microorganisms-Based Bioremediation for Heavy Metal Cleanup: Recent Developments, Phytoremediation Techniques, Regulation Mechanisms, and Molecular Responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 5031, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23095031>

RAKOWSKA, J. Remediation of diesel-contaminated soil enhanced with firefighting foam application. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8824, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65660-3>

RANC, B.; FAURE, P.; CROZE, V.; SIMONNOT, M. O. Selection of oxidant doses for in situ chemical oxidation of soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 312, p. 280–297, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.068>

RAZZAK, S. A.; FARUQUE, M. O.; ALSHEIKH, Z.; ALSHEIKHMOHAMAD, L.; ALKUROUD, D.; ALFAYEZ, A.; HOSSAIN, S. M. Z.; HOSSAIN, M. M. A comprehensive review on conventional and biological-driven heavy metals removal from industrial wastewater. **Environmental Advances**, v. 7, p. 100168, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100168>

RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. **Biotechnology Progress**, v. 36, n. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.3030>

RIZZO, C.; CALDARONE, B.; DE LUCA, M.; DE DOMENICO, E.; GIUDICE, A. Lo. Native bilge water bacteria as biosurfactant producers and implications in hydrocarbon-enriched wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 43, p. 102271, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102271>

ROCHA, M.; MENDES, J.; GIRO, M.; MELO, V.; GONÇALVES, L. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 in cashew apple juice using a 24 full factorial experimental design. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 20, n. 1, p. 49–58, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2298/CICEQ120518100R>

ROCHA, M. V. P. **PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA USANDO SUBSTRATO NÃO CONVENCIONAL**. Fortaleza: [s. n.], 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/15778>. Acesso em: 30 set. 2023.

RODRIGUES, C.; LINO, G.; PACHECO-FERREIRA, H. THE PSYCHOLOGICAL IMPACT CAUSED BY AN ENVIRONMENTAL AND CHEMICAL ACCIDENT WITH DIESEL OIL. **Psicologia em Estudo**, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pe/a/5F74V3jrKdHjF6X8Sty7tRQ/?lang=pt>

ROMEY, A. A. A. Integrated Application of Green Nanotechnology, Bioremediation, and Solubility Enhancing Chemicals for Improving Phytoremediation Efficiency: A Case Study in Egypt. In: **Pesticides Bioremediation**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 455–478. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-97000-0_17

RUBERG, E. J.; WILLIAMS, T. D.; ELLIOTT, J. E. Review of petroleum toxicity in marine reptiles. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 525–536, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02359-9>

SAADOUN, I. M. K. Impact of Oil Spills on Marine Life. In: **Emerging Pollutants in**

the Environment - Current and Further Implications. [S. l.]: InTech, 2015. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/60455>. Acesso em: 29 maio. 2024.

SAKSHI; SINGH, S. K.; HARITASH, A. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: soil pollution and remediation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 10, p. 6489–6512, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02414-3>

SALES DA SILVA, I. G.; GOMES DE ALMEIDA, F. C.; PADILHA DA ROCHA E SILVA, N. M.; CASAZZA, A. A.; CONVERTI, A.; ASFORA SARUBBO, L. Soil Bioremediation: Overview of Technologies and Trends. **Energies**, v. 13, n. 18, p. 4664, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/en13184664>

SAMPAIO, C. J. S.; DE SOUZA, J. R. B.; DAMIÃO, A. O.; BAHIANSE, T. C.; ROQUE, M. R. A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a diesel oil-contaminated mangrove by plant growth-promoting rhizobacteria. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 155, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1686-8>

SANTOS, D.; RUFINO, R.; LUNA, J.; SANTOS, V.; SARUBBO, L. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>

SANTOS, A. P. P. dos. A monitorização da tensão superficial pode servir como um indicador valioso para avaliar a produção de biossurfactantes. **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, 2013. Disponível em: <http://www.tede2.ufpe.br:8080/tede/bitstream/tede2/4529/2/Ana%20Paula%20Pereira%20dos%20Santos.pdf>. Acesso em: 26 maio. 2024.

SANTOS, S. C. dos. Biossurfactantes: potenciais agentes biorremediadores. **Cadernos de Prospeção**, v. 12, n. 5, p. 1531, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.9771/cp.v12i5.33191>

SARUBBO, L. A.; SILVA, M. da G. C.; DURVAL, I. J. B.; BEZERRA, K. G. O.; RIBEIRO, B. G.; SILVA, I. A.; TWIGG, M. S.; BANAT, I. M. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181, p. 108377, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>

SAYED, K.; BALOO, L.; SHARMA, N. K. Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by Bioaugmentation and Biostimulation in Water with Floating Oil Spill Containment Booms as Bioreactor Basin. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 5, p. 2226, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph18052226>

SEVESO, D.; LOUIS, Y. D.; MONTANO, S.; GALLI, P.; SALIU, F. The Mauritius Oil Spill: What's Next? **Pollutants**, v. 1, n. 1, p. 18–28, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pollutants1010003>

SHARMA, B.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 210, p. 10–

22, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.075>
 SHU, Q.; LOU, H.; WEI, T.; LIU, X.; CHEN, Q. Contributions of Glycolipid Biosurfactants and Glycolipid-Modified Materials to Antimicrobial Strategy: A Review. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 227, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020227>

SINGH, H.; BHARDWAJ, N.; ARYA, S. K.; KHATRI, M. Environmental impacts of oil spills and their remediation by magnetic nanomaterials. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 14, p. 100305, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100305>

SIVADON, P.; GRIMAUD, R. **Assimilation of Hydrocarbons and Lipids by Means of Biofilm Formation**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://hal.science/hal-01676300>.
 S.J., G.; BANAT, I. M.; JOSHI, S. J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 23–32, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010>

SRAVYA, K.; SANGEETHA, S. Feasibility study on bioremediation techniques to contaminated soils. **Materials Today: Proceedings**, v. 51, p. 2556–2560, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.12.364>

SU, W.-T.; CHEN, W.-J.; LIN, Y.-F. Optimizing emulsan production of *A. venetianus* RAG-1 using response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 271–279, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1957-0>

SUN, S.; WANG, Y.; ZANG, T.; WEI, J.; WU, H.; WEI, C.; QIU, G.; LI, F. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 281, p. 421–428, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.087>

TESSAROLO, L. de F.; BARRETO, F. T. C.; INNOCENTINI, V.; GONÇALVES, I. Â.; SILVA, L. H. M. M.; CHACALTANA, J. T. A.; PALMA, G.; MARTINS, R. G. A surface Lagrangian algorithm applied to the 2019 South Atlantic oil spill. **Ocean Engineering**, v. 268, p. 113505, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.oceaneng.2022.113505>

TOMAZELA, J. M. **Acidente com vazamento de 35 mil litros de diesel interdita Rodovia dos Bandeirantes**. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://www.terra.com.br/noticias/brasil/cidades/acidente-com-vazamento-de-35-mil-litros-de-diesel-interdita-rodovia-dos-bandeirantes,aba3beaf2f1825780cb1ce1818b5ea58n6usgwmh.html>. Acesso em: 27 fev. 2024.

UZOIGWE, C.; BURGESS, J. G.; ENNIS, C. J.; RAHMAN, P. K. S. M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245>

VALDIVIA-RIVERA, S.; AYORA-TALAVERA, T.; LIZARDI-JIMÉNEZ, M. A.;

GARCÍA-CRUZ, U.; CUEVAS-BERNARDINO, J. C.; PACHECO, N. Encapsulation of microorganisms for bioremediation: Techniques and carriers. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 20, n. 3, p. 815–838, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09577-x>

VELKOVÁ, V.; HYBSKÁ, H.; BUBENÍKOVÁ, T. Possible Oil Spills Disposal for Environmental Water-Body Protection. In: **Recent Oil Spill Challenges That Require More Attention**. [S. l.]: IntechOpen, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.107106>

VIEIRA, I. M. M.; SANTOS, B. L. P.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P. An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 100, p. 1–18, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.05.017>

WENTZEL, A.; ELLINGSEN, T. E.; KOTLAR, H.-K.; ZOTCHEV, S. B.; THRONE-HOLST, M. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 6, p. 1209–1221, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1119-1>

WIKIPÉDIA. **Monoestearato de polietilenoglicol**. [s. l.], 2018. Disponível em: https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Polyethylene_glycol_monostearate.svg. Acesso em: 23 abr. 2024.

WIKIPÉDIA. **Lecitina**. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Lecitina&oldid=64443981>. Acesso em: 23 abr. 2024.

WIKIPÉDIA. **Cloreto de tetrametilamônio**. [s. l.], 2023. Disponível em: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Tetramethylammonium_chloride&oldid=1166153463. Acesso em: 23 abr. 2024.

YANG, C.; FIELDHOUSE, B.; WALDIE, A.; YANG, Z.; HOLLEBONE, B.; LAMBERT, P.; BEAULAC, V. Parallel quantitation of salt dioctyl sodium sulfosuccinate (DOSS) and fingerprinting analysis of dispersed oil in aqueous samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 435, p. 129046, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129046>

ZAGHLOUL, A.; SABER, M. **Modern Technologies in Remediation of Heavy Metals in Soils**Int. J. of Environmental Pollution & Environmental Modelling. [S. l.: s. n.].

ZAPELINI DE MELO, A. P.; HOFF, R. B.; MOLOGNONI, L.; DE OLIVEIRA, T.; DAGUER, H.; MANIQUE BARRETO, P. L. Disasters with oil spills in the oceans: Impacts on food safety and analytical control methods. **Food Research International**, v. 157, p. 111366, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111366>

ZHANG, T.; LIU, Y.; ZHONG, S.; ZHANG, L. AOPs-based remediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soils: Efficiency, influencing factors and environmental impacts. **Chemosphere**, v. 246, p. 125726, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125726>

ZHOU, H.; HUANG, X.; LIANG, Y.; LI, Y.; XIE, Q.; ZHANG, C.; YOU, S. Enhanced bioremediation of hydraulic fracturing flowback and produced water using an indigenous biosurfactant-producing bacteria *Acinetobacter* sp. Y2. **Chemical Engineering Journal**, v. 397, p. 125348, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125348>

ZHU, Z. *et al.* Recent advances in chemical and biological degradation of spilled oil: A review of dispersants application in the marine environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 436, p. 129260, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129260>

ZOBAER, M.; ALI, F.; ANWAR, Md. N.; BAPPI, M. S. H.; BAKAR, T. B.; HOSSAIN, T. J. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil-Spilled Soil and Characterization of Their Secreted Biosurfactants in Pathogen-Inhibition and Oil-Emulsification. **SSRN Electronic Journal**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.2139/ssrn.4320992>

APÊNDICE A – GRÁFICO DE CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DIESEL