



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BELLA GISELLY TORRES ALVES

INOVAÇÃO BIOTECNOLÓGICA PARA BIORREMEDIAÇÃO DE MANGUEZAIS
CONTAMINADOS COM DERIVADOS DO PETRÓLEO

FORTALEZA
2023

BELLA GISELLY TORRES ALVES

INOVAÇÃO BIOTECNOLÓGICA PARA BIORREMEDIAÇÃO DE MANGUEZAIS
CONTAMINADOS COM DERIVADOS DO PETRÓLEO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO - Universidade Federal do Ceara, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A477i Alves, Bella Giselly Torres.
 Inovação biotecnológica para biorremediação de manguezais contaminados com
 derivados de petróleo / Bella Giselly Torres Alves. – 2023.
 95 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-
 Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de
 Biotecnologia), Fortaleza, 2023.
 Orientação: Prof. Dr. Vânia Maria Maciel Melo .
1. Bioaugmentação. 2. Alcanos. 3. Bacterioma. 4. Biodegradação. 5. Startup. I. Título.

CDD 660.6

BELLA GISELLY TORRES ALVES

INOVAÇÃO BIOTECNOLÓGICA PARA BIORREMEDIAÇÃO DE MANGUEZAIS
CONTAMINADOS COM DERIVADOS DO PETRÓLEO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia industrial.

Aprovada em: 28/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Vânia Maria Maciel Melo
Departamento de Biologia (UFC)

Prof^a Dra. Denise Cavalcante Hissa
Departamento de Biologia (UFC)

Prof. Dr. Italo Waldimiro Lima de França
Departamento de Engenharia de Alimentos (UFC)

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho
Departamento de Biologia (UFRPE)

Prof^a. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha
Departamento de Engenharia Química (UFC)

RESUMO

Os manguezais são extremamente vulneráveis a derramamentos de óleo. A descontaminação desses ambientes por microrganismos degradadores de hidrocarbonetos destaca-se como uma alternativa sustentável de biorremediação. Esse estudo teve por objetivo validar um consórcio de duas actinobactérias hidrocarbonoclásticas, previamente isoladas de manguezal, identificadas como *Gordonia sp.* HEX 5 e *Micrococcus sp.* HEX 6 para aplicação em biorremediação de solos contaminados com hidrocarboneto. Primeiro, foi avaliada a presença do gene *alkB* nas bactérias do consórcio através de PCR utilizando *primers* específicos. Também foi avaliada sua capacidade de utilizar hexadecano como fonte de carbono em cultivo em meio mineral. Posteriormente, o consórcio foi imobilizado em esferas de quitosana e testado em microcosmos de sedimento de manguezal contaminados com 1% de hexadecano. Também foram realizadas outras estratégias de biorremediação em microcosmos para comparação e controle. O experimento teve duração de 60 dias e os microcosmos testados receberam o contaminante no início do experimento e após 30 dias. Os tratamentos e os controles foram monitorados mensurando-se a atividade desidrogenásica (ADH) e as alterações na composição taxonômica e na estrutura do bacterioma por meio do sequenciamento massivo do gene RNA ribossomal 16S. Os resultados mostraram que apesar de ambas as cepas de bactérias utilizarem hexadecano como única fonte de carbono, o gene *alkB* foi detectado apenas em uma delas. Nos microcosmos, evidências da biodegradação foram detectadas no 3º. dia após a contaminação nos grupos inoculados com o consórcio, com o máximo de degradação no 12º dia. Após 2ª contaminação, em 30 dias, a resposta foi mais rápida e duradoura. A quitosana estimulou a biodegradação, enquanto a adição de biossurfactantes não teve influência. No pico da biodegradação, o bacterioma foi enriquecido com os filos Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, com maior abundância dos gêneros *Fusibacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio* e *Fontimonas*. A tecnologia testada provou ser capaz de estimular a microbiota autóctone e acelerar a degradação de alcanos em microcosmos. Esse estudo deu origem a um produto chamado BioClineX, com patente submetida ao INPI. Também originou a *startup* Biotech4life Soluções, possibilitando a transformação do conhecimento derivado da ciência em produtos comercializáveis.

Palavras-chave: bioaumentação; alcanos; bacterioma; biodegradação; *startup*.

ABSTRACT

Mangroves are highly vulnerable to oil spills. The decontamination of these environments by hydrocarbon-degrading microorganisms stands out as a sustainable bioremediation alternative. This study aimed to validate a consortium of two hydrocarbonoclastic actinobacteria, previously isolated from mangrove, identified as *Gordonia* sp. HEX 5 and *Micrococcus* sp. HEX 6 for application in bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. First, the presence of the *alkB* gene in the consortium bacteria was evaluated through PCR using specific primers. Their ability to use hexadecane as a carbon source in mineral medium cultivation was also evaluated. Subsequently, the consortium was immobilized in chitosan spheres and tested in microcosms of mangrove sediment contaminated with 1% hexadecane. Other bioremediation strategies were also carried out in microcosms for comparison and control. The experiment lasted for 60 days, and the tested microcosms received the contaminant at the beginning and after 30 days. Treatments and controls were monitored by measuring dehydrogenase activity (DHA) and changes in bacterial community through sequencing of the 16S ribosomal RNA gene. The results showed that although both bacterial strains used hexadecane as the only carbon source, the *alkB* gene was detected in only one of them. In the microcosms, evidence of biodegradation was detected on the 3rd day after contamination in the groups inoculated with the consortium, with maximum degradation on the 12th day. After the 2nd contamination, in 30 days, the response was faster and more lasting. Chitosan stimulated the biodegradation, whereas the addition of biosurfactants did not show influence. Significant changes in the bacteriome were observed with the temporal succession of groups involved in biodegradation. At the peak of biodegradation, the bacteriome was enriched with the phyla Proteobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes, with higher abundance of *Fusibacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, and *Fontimonas*. The tested technology proved to be capable of stimulating the autochthonous microbiota and accelerating alkane degradation in microcosms. This study gave rise to a product called BioClineX, with a patent submitted to INPI. It also gave rise to the startup Biotech4life Solutions, enabling the transformation of knowledge derived from science into marketable products that have a positive impact on the market and society.

Keywords: bioaugmentation; alkanes; bacteriome; biodegradation; startup

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Benefícios da presença dos manguezais na zona costeira.....	15
Figura 2 –	Raízes do mangue da área de proteção ambiental do Rio Pacoti, em Fortaleza, Ceará.....	19
Figura 3 –	Fatores que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos no solo.....	22
Figura 4 –	Vias de biodegradação aeróbica de hidrocarbonetos alifáticos.	25
Figura 5 –	Tipos de técnicas de imobilização de células e suas principais vantagens quando aplicadas em biorremediação.....	27
Figura 6 –	Estrutura da quitina e da quitosana.....	28
Figura 7 –	Curva de crescimento de HEX 5 e HEX 6 em meio mineral contendo hexadecano como única fonte de carbono.....	39
Figura 8 –	Deteção do gene <i>alkB</i> nas cepas HEX 5 e HEX 6.....	39
Figura 9 –	Atividade desidrogenásica expressa em concentração do produto TPF ($\mu\text{g TPF.g}^{-1}$) nos determinados tempos de análise, agrupados por tratamento.....	40
Figura 10 –	Abundâncias relativas de microrganismos a nível de filo encontradas nos microcosmos dos diferentes grupos. Na imagem, apenas táxons com abundância relativa > 5%.....	43
Figura 11 –	Abundâncias relativas de microrganismos a nível de família encontradas nos microcosmos dos diferentes grupos tratados. Na imagem, apenas táxons com abundância relativa > 5%.....	44
Figura 12 –	Abundâncias relativas de microrganismos a nível de gênero encontradas nos microcosmos dos diferentes grupos tratados. Na imagem, apenas táxons com abundância relativa > 5%.....	45
Figura 13 –	Relação entre as abundâncias relativas de microrganismos e a atividade desidrogenásica mensurada no respectivo tempo de análise. Na imagem, apenas táxons a nível de família e de gênero detectados com abundância relativa > 5%.....	46

Figura 14 – Cluster NMDS gerado utilizando a abundância de ASVs (Amplicon Sequence Variant) a nível de gênero.....	48
Figura 15 – Logomarca da empresa Biotech4Life Soluções LTDA.....	62
Figura 16 – Histórico da startup Biotech4Life Soluções.....	64
Figura 17 – Tipos de financiamento adequados a cada fase de desenvolvimento de uma startup.....	67
Figura 18 – Principais características de um bom MVP.....	73
Figura 19 – Escala de desenvolvimento TRL, da universidade ao setor produtivo.....	75
Figura 20 – <i>Design</i> da parte frontal da embalagem do BioClinex.....	76
Figura 21 – Spray Dryer utilizado nos experimentos realizados. Modelo DL-41 – Marca: Yamato-Ohkawara.....	78
Figura 22 – Diferentes versões dos produtos no formato em pó testadas, desenvolvidas pela Biotech4life.....	79
Figura 23 – Resumo das etapas seguidas para a criação da formulação em pó a partir de suspensão concentrada.....	79
Figura 24 – Etapas para registro de produto biorremediador no IBAMA.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais dos microcosmos de sedimento de manguezal.....	34
Tabela 2 – Caracterização do sedimento de manguezal utilizado neste trabalho.....	38
Tabela 3 – Principais táxons detectados nos microcosmos e suas funções já relatadas na literatura.....	47
Tabela 4 – Programas de apoio a pequenas empresas no Brasil.....	70
Tabela 5 – Níveis de Maturidade Tecnológica ou TRL (Technology Readiness Level) e seus aspectos característicos.....	74
Tabela 6 – Comparativo entre custos para preparo de 1L do meio MRS comercial do meio B4L.....	77

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1. VALIDAÇÃO DE ESTRATÉGIA INOVADORA DE BIORREMEDIAÇÃO DE MANGUEZAIS CONTAMINADOS COM HEXADECANO.....	12
2	INTRODUÇÃO.....	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	Manguezal.....	15
3.1.1	<i>O Ecossistema manguezal.....</i>	<i>15</i>
3.1.2	<i>Microbioma do sedimento de manguezal.....</i>	<i>16</i>
3.2	Contaminação do manguezal por petróleo e derivados.....	18
3.3	Biorremediação.....	20
3.3.1	<i>Estratégias de biorremediação.....</i>	<i>21</i>
3.3.2	<i>Vias de biodegradação aeróbica de alcanos.....</i>	<i>23</i>
3.4	Imobilização de microrganismos.....	25
3.5	Biossurfactantes em biorremediação.....	20
3.6	Estudos moleculares da dinâmica microbiana do manguezal.....	30
4	OBJETIVOS.....	31
4.1	Geral	31
4.2	Específicos	31
5	MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1	Coleta e caracterização de sedimentos de manguezal.....	32
5.2	Avaliação das cepas do consórcio quanto a capacidade de utilizar hexadecano como única fonte de carbono.....	32
5.3	Extração do DNA genômico das cepas HEX 5 e HEX 6 para detecção do gene <i>alkB</i>	33
5.4	Imobilização do consórcio de bactérias e quantificação da densidade de células imobilizadas.....	33
5.5	Ensaio de biorremediação de sedimentos de manguezal em microcosmo.....	34
5.6	Atividades desidrogenásica.....	35
5.7	Extração de DNA dos microcosmos.....	36

5.8	Sequenciamento do gene 16S rDNA dos microcosmos.....	36
5.8.1	<i>Processamento de dados</i>	37
5.8.2	<i>Análise estatística</i>	37
6	RESULTADOS	37
6.1	Caracterização dos sedimentos.....	37
6.2	Avaliação das cepas do consórcio quanto a capacidade de utilizar hexadecano como única fonte de carbono.....	38
6.3	Deteção do gene alkB.....	39
6.4	Avaliação da eficiência do processo de imobilização do consórcio de bactérias.....	40
6.5	Ensaio de biorremediação de sedimentos de manguezal realizado em microcosmos.....	40
6.6	Sequenciamento do gene 16S rDNA dos microcosmos.....	42
6.7	Relação entre abundâncias relativas de microrganismos e a atividade desidrogenásica.....	45
7	DISCUSSÃO	49
8	CONCLUSÕES	59
9	CAPÍTULO 2. DESENVOLVIMENTO DE UM BIORREMEDIADOR: DA BANCADA AO MERCADO	60
10	INTRODUÇÃO	60
11	RELATO DE EXPERIÊNCIA - O SURGIMENTO DE UMA STARTUP DE BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL: BIOTECH4LIFE SOLUÇÕES	61
12	IMPORTÂNCIA DA PROPRIEDADE INTELECTUAL PARA EMPRESAS DE BASE TECNOLÓGICA	64
13	FINANCIAMENTO	66
13.1	Financiamento público.....	67
13.2	Financiamento privado.....	70
14	ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO MÍNIMO VIÁVEL	72
14.1	BioClinex – Remediador de contaminação ambiental por petróleo.....	75
14.2	Formulação de produtos.....	76
15	REGISTRO DE PRODUTOS BIORREMEDIADORES	80

16	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXO A - PATENTE DO PRODUTO BIOCLINEX DEPOSITADA	
	JUNTO AO INPI.....	96

1 CAPÍTULO 1. VALIDAÇÃO DE ESTRATÉGIA INOVADORA DE BIORREMEDIAÇÃO DE MANGUEZAIS CONTAMINADOS COM HEXADECANO

2 INTRODUÇÃO

O manguezal é um ecossistema salino, que sofre influência das marés e é encontrado ao longo da costa de regiões tropicais e subtropicais. Esse ambiente desempenha importantes funções ecossistêmicas. Por ser um local de intensa ação de ciclos biogeoquímicos da matéria, apoia cadeias alimentares complexas e importantes para o equilíbrio ambiental (COLARES; MELO, 2013; LUO ET AL., 2018). Apesar da sua importância, são ambientes ameaçados devido à sua exposição à constante contaminação antropogênica e à sua suscetibilidade à fenômenos ambientais costeiros (COTTA ET AL., 2019).

Os impactos naturais e antropogênicos ao manguezal resultam em perda da biodiversidade e das funções do ecossistema. Também podem contribuir para a diminuição da proteção costeira contra inundações e tempestades, reduzindo a resiliência desse ambiente a perturbações (BARBIER, 2016).

Dentre os impactos que afetam diretamente os ambientes marinhos e costeiros estão os derramamentos de petróleo acidentais que ocorrem em plataformas *offshore* ou em navios petroleiros (MAITI; CHOWDHURY, 2013; VILLELA *et al.*, 2019). No Brasil, um exemplo disso foi o acidente que ocorreu em 2019, atingindo mais de 3000 km da costa brasileira e que afetou ecossistemas costeiros, incluindo os manguezais, causando severos impactos ambientais e socioeconômicos (SOARES *et al.*, 2020). Os constituintes do petróleo são poluentes perigosos, por serem tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (STANINSKA-PIĘTA *et al.*, 2019). Por isso, a contaminação causada por eles tem se tornado uma preocupação ambiental no mundo todo (VILLELA *et al.*, 2019). Compreender a resposta das comunidades microbianas a essas contaminações é essencial para avaliar a estabilidade e o funcionamento dos ecossistemas. Os principais processos que dão suporte à vida ocorrem no microbioma, por isso suas funções precisam ser preservadas (COTTA *et al.*, 2019). Além disso, os microrganismos que podem utilizar compostos poluentes como fonte de carbono e energia, fazem isso através de enzimas especializadas, o que os habilita

para aplicação em processos de biorremediação (ADAMS *et al.*, 2015; SHINTANI *et al.*, 2018; WANAPAIKAN *et al.*, 2018).

A biorremediação tem sido considerada como a mais emergente tecnologia de tratamento de ambientes contaminados com petróleo e derivados. Essa tecnologia é ambientalmente amigável e eficiente na remoção de contaminantes (PANIAGUA-MICHEL, 2020). Porém, os microrganismos aplicados a essa finalidade precisam ser adaptados às particularidades do ambiente a ser tratado para que sua ação seja eficaz (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASIL, 2016).

Dentre as estratégias de biorremediação existentes, a atenuação natural consiste em um método passivo que depende dos processos físicos, químicos e biológicos naturais de degradação dos contaminantes do ambiente. Já a bioaumentação consiste na adição de um microrganismo ou de um consórcio de microrganismos degradadores ao local contaminado; e a bioestimulação envolve a adição de nutrientes ou de cofatores ao local para melhorar a degradação de contaminantes pelos microrganismos nativos ou adicionados (TYAGI; DA FONSECA; DE CARVALHO, 2011; MACHADO *et al.*, 2019). Muitas vezes, o uso de consórcios em bioaumentação é preferível para obter maior complementaridade metabólica na degradação de um poluente (MEYER *et al.*, 2014).

Em biorremediação, o uso de consórcios microbianos possibilita a cooperação sinérgica de microrganismos na degradação de poluentes. Em muitos casos, a comunidade microbiana nativa desempenha um papel complementar nas etapas de biodegradação. Essa relação pode ser estudada em microcosmos, onde a taxa metabólica e a estrutura da comunidade microbiana do solo pode elucidar o papel dos grupos de microrganismos mais envolvidos na decomposição desses compostos. O sequenciamento de amplicons das regiões hipervariáveis do 16S rRNA é uma ferramenta poderosa para estudar de forma integral a composição bacteriana e a abundância de determinados grupos de microrganismos em estudos de biodegradação em microcosmos (BEZZA; CHIRWA, 2017; LIU *et al.*, 2019).

A biodegradação pode ser realizada por microrganismos imobilizados em matrizes biocompatíveis, o que pode conferir vantagens a eles quando aplicados no ambiente (PARTOVINIA; RASEKH, 2018). Dentre essas matrizes, a quitosana pode ser utilizada, pois é um polímero biodegradável derivado da quitina, um resíduo da indústria da carcinicultura, que também pode ser utilizada como fonte de carbono pelos organismos presentes no ambiente (ANGELIM *et al.*, 2013).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a biodegradação de hexadecano, componente da fração de alcanos do petróleo, por um consórcio de actinobactérias isoladas de manguezal, imobilizado em esferas de quitosana para biorremediação de sedimentos de manguezais oleados visando validar essa estratégia para o desenvolvimento de um produto biorremediador. Os efeitos da mudança na estrutura da comunidade microbiana e sua relação com as taxas de biodegradação foram avaliados através de sequenciamento massivo do gene 16S do RNA ribossomal.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Manguezal

3.1.1 O Ecossistema manguezal

Manguezais são ecossistemas costeiros de transição que conectam o ambiente marinho à estuários e ao ambiente terrestre. São muito característicos de regiões tropicais e subtropicais, ocupando cerca de 60% a 75% da costa dessas regiões. Aproximadamente 75% dos manguezais do mundo estão concentrados em apenas 15 países, sendo Indonésia, Austrália e Brasil os três que possuem a maior abundância desses biomas (GIRI *et al.*, 2011; HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

No Brasil, esse ecossistema está presente em 338 municípios, onde vivem cerca de 44 milhões de pessoas, o que representa 20% da população nacional. Os benefícios econômicos dos manguezais do Brasil podem chegar a US\$ 5 bilhões, contribuindo com atividades como pesca e turismo, que beneficiam direta e indiretamente o país. Além do seu valor econômico, os manguezais possuem uma série de serviços ecossistêmicos de valor incalculável, pois são ricos em biodiversidade única, caracterizados pelas suas condições de alta salinidade, alta temperatura, influência de marés e sedimentos anaeróbicos lamacentos (DINIZ *et al.*, 2019). Eles estão entre os ecossistemas mais produtivos e biologicamente importantes do mundo, pois servem de abrigo, de alimentação e zonas de reprodução para crustáceos, moluscos, peixes de importância comercial e aves migratórias e residentes (AFONSO *et al.*, 2021).

Mesmo cobrindo uma pequena parte da superfície da Terra, os manguezais são responsáveis por sequestrar cerca de 22,8 milhões de toneladas métricas por ano de

carbono, e sua vegetação nativa ajuda na estabilização da costa e na redução de impactos de desastres naturais, como tsunamis e furacões (GIRI *et al.*, 2011; TIRALERDPANICH *et al.*, 2018).

A comunidade do manguezal é composta por espécies de plantas, animais e microrganismos que possuem adaptações que possibilitam sua sobrevivência às condições variáveis de inundação e estresse salino impostas pelo regime das marés (MAITI E CHOWDHURY, 2013).

Figura 1 - Benefícios da presença dos manguezais na zona costeira

OS SERVIÇOS DOS MANGUEZAIS

A presença de manguezais na costa traz benefícios à população, à economia, ao ambiente marinho, entre outros. Conheça o que a manutenção deste ambiente proporciona:



Fonte: Oceano sem mistérios, Fundação GrupoBoticário, 2021.

Por ser um ecossistema de grande importância econômica e ecológica, sua proteção está garantida na legislação brasileira (Leis Federais 9.605/1998,

11.428/2006 e 12.651/2012 e Resolução Conama 303/2002). Mesmo protegidos por leis federais, os *status* de proteção variam de região para região. No Nordeste, apenas 23% dos manguezais estão localizados em áreas protegidas, enquanto no Norte 88% e no Sul 70% dos manguezais estão em áreas protegidas (PELAGE *et al.*, 2019).

Vários fatores de risco ameaçam esses ambientes. Entre as atividades que mais trazem impactos para o ecossistema estão mineração, sobrepesca, agricultura, aquicultura/carcinicultura, descarga de efluentes não tratados, aterramento, exploração de petróleo, desmatamento, ocupação irregular e expansão demográfica (MICHEL, 2014; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018).

3.1.2 Microbioma do sedimento de manguezal

O termo 'microbioma' é usado para descrever o conjunto de microrganismos que vivem em um determinado hospedeiro ou que ocupam conjuntamente um ambiente. Os microbiomas de manguezais têm sido descritos e suas características taxonômicas e funcionais revelam que cada região abriga uma comunidade característica. Em manguezais tropicais, por exemplo, a comunidade microbiana é composta majoritariamente de bactérias e fungos, seguidos de algas e protozoários (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

A informação taxonômica é a fonte de informação mais utilizada em estudos de microbiomas. As comunidades microbianas complexas apresentam altas taxas de transferência de material genético, resultando em funções ecológicas e metabólicas similares desempenhadas por organismos distintos, tornando a descrição taxonômica de um dado local mais completa quando associada à descrição funcional (ANDREOTE; SILVA; MELO; ROESCH, 2017). A partir das informações obtidas do microbioma de um ambiente é possível inferir algumas informações relacionadas aos ciclos biogeoquímicos, como por exemplo os grupos de microrganismos envolvidos no metabolismo de carbono, nos processos de fixação de nitrogênio e no metabolismo de enxofre (ANDREOTE *et al.*, 2012).

Os manguezais possuem um papel de particular importância para os ciclos biogeoquímicos. Isso se deve à presença de uma comunidade de microrganismos capaz de realizar a ciclagem de nutrientes de forma eficiente. As regiões de manguezais são ricas em matéria orgânica, proveniente de plantas, sedimentos e rios. Esses detritos são uma importante fonte de nutrientes tanto para os organismos

locais, quanto para outras áreas costeiras. O mecanismo de reciclagem e conservação de nutrientes desses ambientes é observado principalmente pela estreita relação entre microrganismos e plantas. As comunidades microbianas transformam constantemente os nutrientes da vegetação morta em nitrogênio, fósforo e outros nutrientes que podem ser utilizados pelas plantas que, por sua vez, atuam como fonte de nutrientes e fatores de crescimento para esses microrganismos (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; JENNERJAHN; ITTEKKOT, 2002).

O manguezal é um ambiente altamente variável, caracterizado por estar sob influência das marés onde há constantes alterações na salinidade do ambiente, no pH e na disponibilidade de nutrientes. Essas mudanças impactam a diversidade microbiana que se adapta para manter o funcionamento do ecossistema (ANDREOTE *et al.*, 2012). Muitas vezes, a comunidade bacteriana é caracterizada por um grupo de microrganismos dominantes e um grupo de microrganismos com menor densidade populacional. Ambos apresentam importante papel dentro do microbioma do manguezal e são responsivos às variações ambientais, indicando a essencialidade desses grupos na manutenção do funcionamento desse ecossistema em diferentes condições (ALLARD *et al.*, 2020).

Os manguezais armazenam de 10 a 15% do carbono orgânico encontrado em sedimentos costeiros, exportando 11% do carbono particulado terrestre para o oceano (ALONGI, 2014). O grande potencial de armazenamento de carbono dos manguezais é um dos serviços ecossistêmicos mais reconhecidos no contexto das mudanças climáticas. Esse potencial é resultado de alta produtividade primária líquida do manguezal, tornando-o um ecossistema valioso para reduzir o excesso de CO₂ atmosférico através da fotossíntese e armazenamento de carbono a longo prazo nos solos. Nesse sentido, o microbioma do solo de manguezal exerce importante papel no armazenamento de carbono, pois a microbiota simbiótica nas raízes das plantas é responsável por melhorar a disponibilidade de nutrientes do solo para as plantas, aumentando a sua produtividade. Além disso, a microbiota possui papel fundamental na decomposição e mineralização da matéria orgânica (OCHOA-GÓMEZ *et al.*, 2019).

Assim como as alterações naturais, as alterações causadas por contaminação causam mudanças na estrutura do microbioma do sedimento de manguezais. Distúrbios como despejo de esgoto, derramamento de petróleo e dejetos

animais da aquicultura mudam a estrutura, inclusive a relação de microrganismos aeróbios e anaeróbios presentes no sedimento de manguezal (ALONGI, 1988).

3.2 Contaminação do manguezal por petróleo e derivados

A contaminação ambiental por petróleo é um problema que tem despertado enorme preocupação nos últimos anos devido aos recorrentes acidentes de derramamento de óleo. Isso é atribuído principalmente ao aumento no consumo global de petróleo como fonte de energia e de matéria-prima para refinarias e indústrias petroquímicas (VARJANI E UPASANI, 2017).

Entre os diferentes tipos de poluição ambiental, a poluição dos manguezais emerge como um dos problemas que causa grande preocupação, devido a importância ecológica desse ecossistema. As principais fontes de contaminação de manguezais por hidrocarbonetos de petróleo incluem poços de petróleo e gás, refinarias de petróleo e estações de extração de petróleo *offshore* (AL-HAWASH *et al.*, 2018). Devido à localização costeira, os manguezais estão entre os principais locais para os quais os derramamentos de petróleo *offshore* convergem, funcionando muitas vezes como depósitos de petróleo. Por isso, esses ambientes são suscetíveis ao acúmulo de hidrocarbonetos de petróleo em seus sedimentos, o que impacta fortemente esses ecossistemas (SANTOS *et al.*, 2011).

Observações de eventos de derramamento de óleo ao redor do mundo têm mostrado que os manguezais sofrem efeitos letais e subletais devido à exposição ao petróleo. Esses danos podem ocorrer por efeitos físicos ou por efeitos toxicológicos do petróleo ao bioma do manguezal (RENEGAR *et al.*, 2021).

Os danos físicos se dão pela viscosidade do petróleo. Por ser viscoso, o petróleo pode ser depositado na superfície das plantas, do solo e dos animais, causando asfixia ou outra interferência física que afete a função fisiológica normal da biota. Os mangues desenvolveram características únicas que permitem sobreviver no sedimento argiloso, com baixa concentração de oxigênio e alta salinidade, como a presença de raízes aéreas e pneumatóforos em suas plantas (Figura 2). Essas estruturas características dificultam a remoção do óleo por métodos mecânicos, o que agrava a situação (MICHEL, 2014).

Figura 2 – Raízes de mangue na área de proteção ambiental do Rio Pacoti, Fortaleza, Ceará.



Fonte: Foto captada pela autora (2019).

A toxicidade aguda ou crônica do óleo causa um impacto adicional ao sufocamento físico. Quando o sedimento é contaminado, a microbiota é fortemente afetada, o que pode causar perda da biodiversidade, tornando a região ainda mais vulnerável aos impactos. Após exposições prolongadas, pode ocorrer uma redistribuição das populações presentes nesse ambiente, com aumento da prevalência de organismos mais resilientes à contaminação, remodelando o ecossistema e podendo inclusive resultar na perda de espécies-chave para o funcionamento ecossistêmico. A quantidade de óleo que atinge os manguezais e o tempo que o óleo derramado permanece em contato ao ambiente são variáveis que determinam a gravidade do efeito tóxico da contaminação. Sob condições severas de presença de óleo, os impactos aos manguezais podem continuar por anos ou décadas e resultar em perda permanente do *habitat* (ONYENA; SAM, 2020).

As quatro principais frações de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) são: alcanos, compostos aromáticos, compostos de nitrogênio-enxofre-oxigênio (NSO) e a fração de asfalto. A fração composta por alcanos possui número de carbonos variando de 1 a 40, e podem ser compostos de cadeia linear ou ramificada. Os alcanos são principalmente hidrocarbonetos saturados como o hexadecano. Os compostos aromáticos contêm pelo menos um anel benzênico, essa fração pode variar de benzeno (um anel aromático) a estruturas aromáticas policíclicas multi-aneladas compostas de derivados de hidrocarbonetos (VARJANI, 2017). A volatilidade e a solubilidade em água dos hidrocarbonetos de maior peso molecular são menores do que os hidrocarbonetos de baixo peso molecular e, portanto, a persistência relativa dos hidrocarbonetos de alto peso molecular no ambiente é maior (KHAN *et al.*, 2018).

O tipo de óleo derramado influencia no grau de impacto ao ambiente devido às diferenças na persistência, toxicidade e viscosidade. Normalmente, os hidrocarbonetos de baixo peso molecular podem apresentar maior toxicidade aos microrganismos do local pois estão mais biodisponíveis, porém ambientes contaminados por esse tipo também são mais rapidamente recuperados (MICHEL; RUTHERFORD, 2014).

Após o derramamento de petróleo, é necessário a aplicação de técnicas de resposta a esses impactos. É importante ressaltar que para que as medidas de recuperação de manguezais sejam efetivas, devem ser realizadas com a participação integrada das comunidades que vivem nos arredores do local, dos órgãos governamentais, dos institutos de pesquisa e dos órgãos regulatórios, onde cada uma dessas esferas assume funções complementares nesse processo (ONYENA; SAM, 2020).

3.3 Biorremediação

Em situações de contaminação, maioria dos esforços de limpeza de óleo que chega à zona costeira e atinge o solo requer métodos mecânicos, pois são uma solução rápida para remover contaminantes e reduzir os danos ambientais. No entanto, existem desvantagens associadas a estes métodos. Por exemplo, o uso de lavagem de alta pressão para remover o óleo pode causar impacto no local contaminado, além de serem trabalhoso, demorado e incapaz de remover completamente os contaminantes do óleo, deixando para trás uma grande quantidade de óleo adsorvido no solo. Quando é feito o uso de solventes e dispersantes químicos associados aos métodos mecânicos, eles podem ter efeito tóxico ao meio ambiente, causando outro tipo de contaminação. Essas ações convencionais de primeira resposta não são, portanto, capazes de produzir uma limpeza completamente eficiente e sustentável em situações de derramamentos de óleo. Existe uma variedade de tecnologias disponíveis para a remediação de solo contaminado com óleo, desde tecnologias amplamente aplicadas, como limpeza por aplicação de biossurfactantes e biorremediação, até tecnologias emergentes, como remediação eletrocinética e sonicação (LIM; LAU; POH, 2016; YUAN et al., 2013).

As tecnologias de remediação de solo contaminado com óleo podem ser classificadas em métodos biológicos, químicos, térmicos e físico-químicos. Dentre elas, os métodos biológicos consistem na aplicação de organismos vivos ou produtos

do seu metabolismo no tratamento e recuperação de ambientes contaminados, num processo chamado de biorremediação (ADAMS *et al.*, 2015).

A maioria dos processos microbiológicos para descontaminação de manguezais contaminados com óleo envolve basicamente o isolamento e a caracterização de espécies envolvidas na biodegradação. No entanto, toda a comunidade do local contaminado estará envolvida no processo de descontaminação através de interações complexas. Por isso, é importante entender que o microbioma atua cooperativamente para restauração da qualidade de ambientes contaminados (CHICCA *et al.*, 2022).

3.3.1 Estratégias de biorremediação

Existem diferentes estratégias de biorremediação, e elas podem ser realizadas *in situ* (no local contaminado) ou *ex situ* (fora do local onde ocorreu a contaminação). Dentre as estratégias *in situ*, podemos destacar: atenuação natural, técnica de *land farming* (aeração do solo), bioaugmentação e bioestimulação. Dentre as estratégias *ex situ*, podemos citar a lavagem de solo contaminado com biossurfactantes, limpeza em biorreatores e tratamento em biopilhas (NWANKWEGU *et al.*, 2016).

As estratégias *in situ* possuem vantagens de terem menor custo, pois não necessitam do transporte do material contaminado e podem ser aplicados a grandes áreas contaminadas. Dentre elas, a bioaugmentação consiste na adição de microrganismos degradadores de poluentes. Muitas vezes esses microrganismos foram isolados de outros ambientes que também foram expostos a contaminantes, causando uma seleção de organismos capazes de viver em locais poluídos. Isso pode ser constatado, por exemplo, em um estudo em que foi visto que em ambientes prístinos apenas 0,1% dos microrganismos são capazes de degradar hidrocarbonetos, contudo esse número aumenta para 10% em locais poluídos com petróleo (VARJANI, 2017).

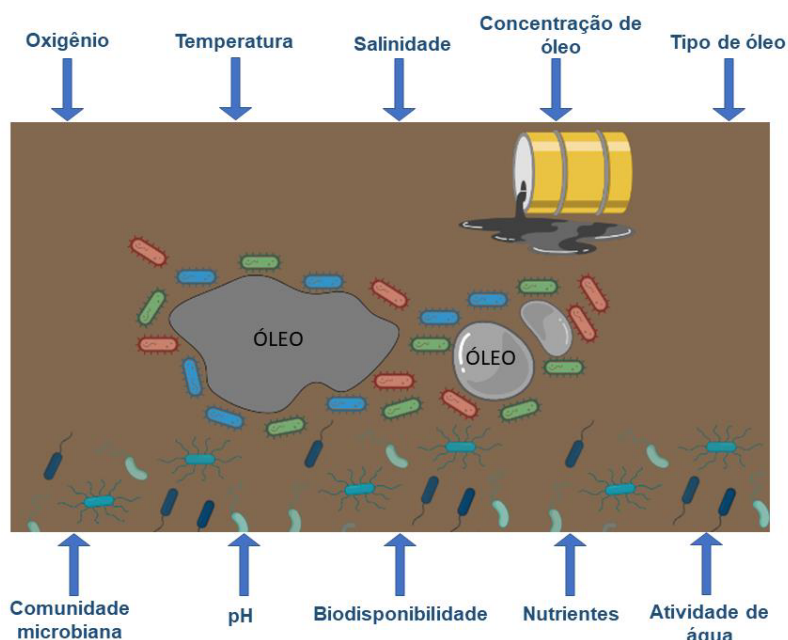
A bioestimulação, por sua vez, consiste em adicionar nutrientes, oxigênio, aceptores de elétrons ou substratos que estimulem o metabolismo dos microrganismos do local contaminado, contribuindo para a degradação do contaminante, para a manutenção da atividade biológica e para ciclagem de nutrientes importantes realizada pelos microrganismos (ADAMS *et al.*, 2015).

Tanto a bioestimulação como a bioaugmentação têm como objetivo aumentar as taxas de biodegradação do contaminante. Esse é o processo primário envolvido nas estratégias de biorremediação, e para que alcance taxas elevadas é necessário que

os microrganismos possuem capacidades catabólicas como indução de genes que codificam enzimas específicas que estejam envolvidas na clivagem dos contaminantes. Quando os microrganismos estão em condições favoráveis de crescimento, eles podem alcançar níveis elevados de biodegradação (VARJANI e UPASANI, 2017).

A biodegradação de hidrocarbonetos é influenciada principalmente pela quantidade e pela natureza desses compostos presentes no ambiente. Além disso, fatores ambientais também podem interferir nesse processo (Figura 3).

Figura 3 – Representação de contaminação de petróleo em solo repleto de microrganismos e os fatores que afetam a taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo.



Fonte: elaborada pela autora

A composição da comunidade bacteriana nativa no local do derramamento é um fator importante para a biodegradação dos contaminantes, uma vez que essa comunidade pode ter uma contribuição significativa no processo (LIU; BACOSA; LIU, 2017). A exposição a hidrocarbonetos leva a respostas adaptativas, indicando a importância da análise genômica dessas comunidades visando compreender sua atuação na recuperação do local contaminado. A correlação de dados genômicos à resposta das comunidades microbianas pode ajudar a definir a melhor estratégia de recuperação de ambientes através da biorremediação (GOMES *et al.*, 2010).

Muitos gêneros de bactérias naturalmente presentes no meio ambiente têm a capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo. Várias dessas bactérias são os gêneros *Altererythrobacter*, *Neptuniibacter*, *Colwellia*, *Cycloclasticus*, *Pseudoalteromonas*, *Actinobacteria*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Pandoraea*, *Corynebacterium* e representantes das ordens Oceanospirillales e Rhodobacterales. Algumas bactérias, incluindo *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus*, *Oleispira* e algumas outras bactérias hidrocarbonoclasticas obrigatórias, possuem baixa abundância ou são indetectáveis antes da poluição, mas tornam-se dominantes após a contaminação por petróleo (BACOSA et al., 2022a; YAKIMOV; TIMMIS; GOLYSHIN, 2007).

Esses microrganismos autóctones influenciam significativamente na transformação e no destino dos hidrocarbonetos de petróleo no meio ambiente. Eles podem influenciar até em como microrganismos adicionados a um ambiente através de estratégias de bioaugmentação atuam. Diferentes bactérias têm diferentes habilidades de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, pois cada uma tem enzimas catalíticas específicas (XU et al., 2018). Até mesmo bactérias pertencentes à mesma espécie têm diferentes capacidades de degradação de hidrocarbonetos (BACOSA; INOUE, 2020).

Nenhuma espécie bacteriana pode, isoladamente, degradar completamente o óleo. Isso sugere que o uso de consórcios de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos pode ser mais eficiente para a biorremediação de óleos derramados. Enquanto um membro do consórcio produz enzimas necessárias para oxidar a cadeia de hidrocarbonetos, outro produz os nutrientes requeridos pelos degradadores primários, por exemplo (BACOSA et al., 2022b). Portanto, em condições otimizadas, um consórcio bacteriano pode ser uma solução eficaz e sustentável para a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo.

3.3.2 Vias de biodegradação aeróbica de alcanos

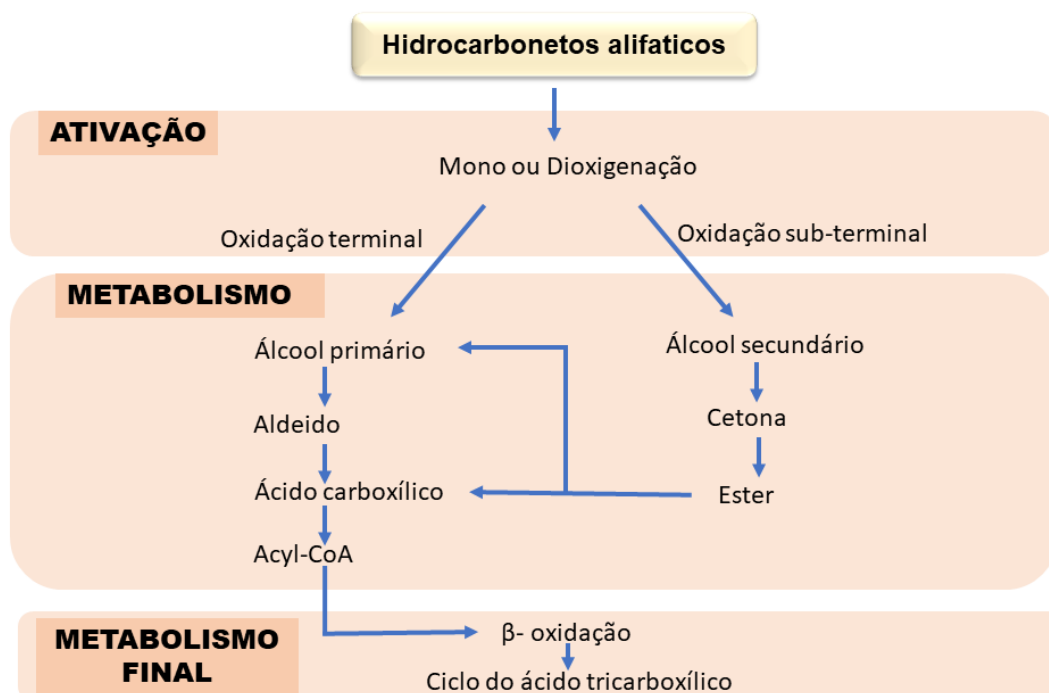
Após a captação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos, o ataque intracelular inicial à sua molécula é um processo oxidativo, pelo qual a ativação e incorporação de oxigênio são catalisadas por oxigenases e peroxidases. O catabolismo bacteriano aeróbico envolve uma ampla variedade de vias periféricas que ativam substratos diversos em um número limitado de intermediários comuns, que são posteriormente clivados e processados por algumas vias centrais do metabolismo da

célula. As vias metabólicas e os genes codificadores responsáveis pela degradação de compostos aromáticos específicos têm sido caracterizados para muitas cepas bacterianas isoladas, predominantemente de *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (NATALIA; DE OLIVEIR, 2013).

Para alcanos de cadeias de comprimento médio e longo, os microrganismos podem acessar os hidrocarbonetos por meio da aderência de gotículas a superfície celular ou por acesso facilitado por biossurfactantes (CHIKERE, OKPOKWASILI e CHIKERE, 2011). Após a captação dos hidrocarbonetos, ocorre o primeiro ataque ao poluente no ambiente intracelular, por meio da oxidação e ativação. Esse passo inicial envolve enzimas que têm exigência estrita de oxigênio molecular, como por exemplo as monooxigenases ou dioxigenases. A via mais comum depende da ação das enzimas monooxigenases e é específica para n-alcanos. A monooxigenase ataca o grupo metila terminal onde um álcool primário é formado, o álcool é então oxidado ao correspondente aldeído e ácido graxo (**Figura 4**). Na segunda via, uma enzima dioxigenase atua no grupo metil terminal de um n-alcano, resultando na adição de dois átomos de oxigênio. Isso resulta na formação de um peróxido que é convertido em um ácido graxo. Os grupos de ácidos carboxílicos nos ácidos graxos resultantes de ambas as vias são então metabolizados via β -oxidação, uma via catabólica comum encontrada na maioria das células vivas, para formar acetil-CoA ou propionil-CoA [dependendo do número de átomos de carbono (pares ou ímpares) no n-alcano]. Essas vias de degradação transformam contaminantes orgânicos em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. A síntese de biomassa celular ocorre a partir dos metabólitos dos precursores centrais, como o acetil-CoA, o piruvato e o succinato. Os sacarídeos necessários para diferentes processos de biossíntese e crescimento são sintetizados via gliconeogênese (AL-HAWASH *et al.*, 2018).

Os hidrocarbonetos podem ser seletivamente metabolizados a partir de uma cepa individual de microrganismos ou de um consórcio microbiano de cepas pertencentes ao mesmo gênero ou a gêneros diferentes. Consórcios apresentam a vantagem de possuírem complementaridade metabólica para completa degradação de hidrocarbonetos se comparados ao uso de culturas puras (ANGELIM *et al.*, 2013).

Figura 4 - Vias de biodegradação aeróbica de hidrocarbonetos alifáticos.



Fonte: elaborado pela autora.

A degradação de hidrocarbonetos por microrganismos em solos contaminados pode ser avaliada através da medida de indicadores como a respiração do solo, biomassa, atividades enzimáticas e contagens de células microbianas. Esses indicadores fornecem informações sobre a presença de microrganismos viáveis, bem como sobre a intensidade, o tipo e a duração do efeito de poluentes na atividade metabólica do solo, sendo assim adequados para descrever o curso de experimentos de biorremediação. Dentre as diversas enzimas pesquisadas, a atividade da enzima desidrogenase (ADH) tem sido reconhecida como um importante indicador bioquímico do solo, pois é um indicador da atividade microbiana geral. As desidrogenases desempenham papel fundamental durante a oxidação da matéria orgânica presente no solo, atuando na transferência de hidrogênio e elétrons entre os compostos orgânicos sujeitos a oxidação e seus receptores finais. Em decorrência disso, o método vem sendo empregado como estimador da capacidade respiratória e oxidativa em solos (VAN DER WAARDE *et al.*, 1995; MARGESIN, 1999; KUMAR, 2013).

3.4 Imobilização de microrganismos

Muitas estratégias de biorremediação têm sido desenvolvidas para alcançar melhores taxas de degradação. Uma delas é a utilização de suportes de imobilização. A imobilização consiste no processo de retenção de células ou moléculas de interesse

em suportes poliméricos (KAREL *et al.*, 1985). As técnicas de imobilização podem ser classificadas em quatro grupos com base em seus mecanismos: fixação ou adsorção em uma superfície sólida; inserção em uma matriz porosa por aprisionamento ou encapsulamento; proteção celular por uma barreira (mantendo as células dentro de uma membrana); e agregação como floculação ou reticulação (**Figura 5**).

A imobilização por aprisionamento em matrizes porosas permite a difusão de substratos e produtos entre o meio e os microrganismos. No aprisionamento, as células ficam envoltas por uma camada de matriz de imobilização, enquanto no encapsulamento as células ficam livres em solução, mas restritas por uma camada fina de matriz. Muitas vezes o aprisionamento de células é reconhecido por ser mais durável do que o encapsulamento e, portanto, ser mais adequado para aplicações ambientais. As técnicas de aprisionamento podem ser categorizadas em gelificação ionotrópica de polímero poliônico por reticulação do polímero com cátions multivalentes (alginato e quitosana), gelificação induzida por temperatura (agarose), polimerização orgânica por reação química entre monômeros (poliacrilamida) e precipitação por separação de fases (poliestireno) (SIRIPATTANAKUL e KHAN, 2010). Para aplicações ambientais, os polímeros naturais como ágar, alginato, carragenina e quitosana são mais desejáveis.

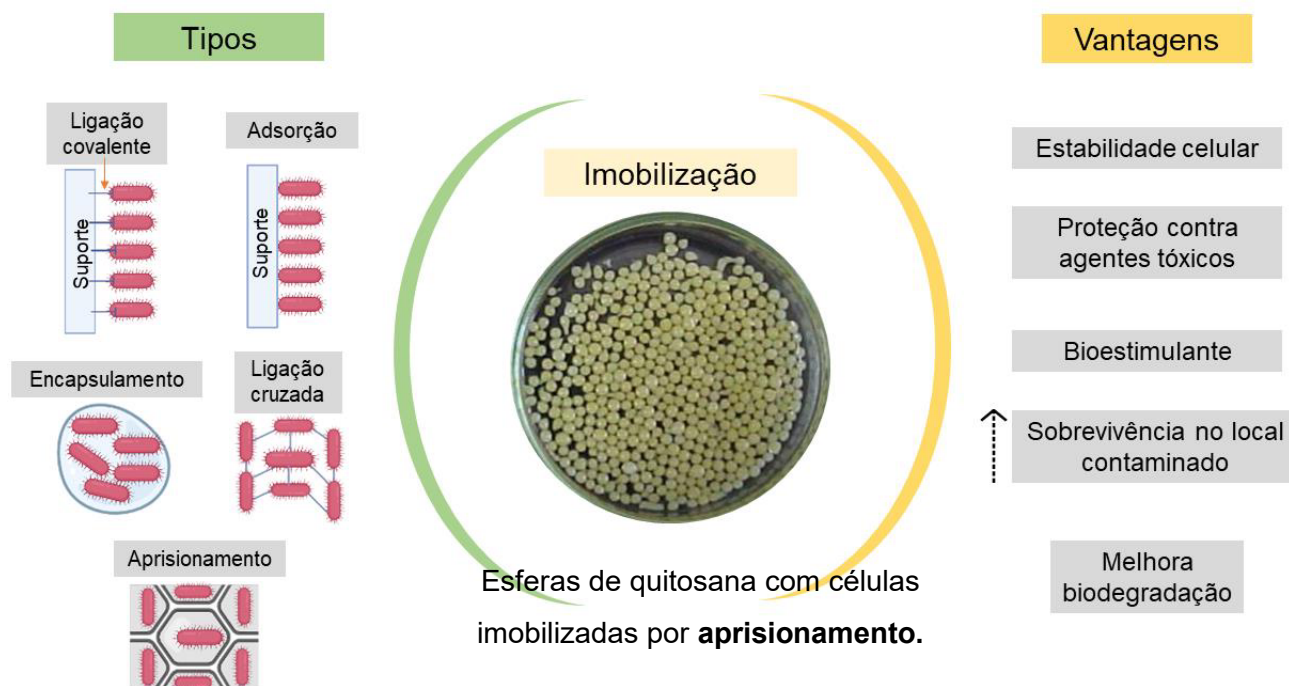
Muitas vezes, essas matrizes de imobilização podem atuar como agentes de restauração e conservação do solo, contribuindo para manutenção do balanço hídrico, da atividade biológica (funcionando como bioestimulante), fornecendo matéria orgânica e aumentando a fertilidade do solo (NWANKWEGU *et al.*, 2016). Isso é muito relevante para a biorremediação, uma vez que esses fatores contribuem para aumentar a taxa de degradação. A fixação em uma superfície sólida, aprisionamento e / ou métodos de encapsulação tem sido amplamente aplicado para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo (PARTOVINIA e RASEKH, 2018).

Dentre essas matrizes, a quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, que por sua vez é o segundo polímero mais abundante na natureza (**Figura 6**).

A quitina está presente nas carapaças de crustáceos, que são consideradas resíduos pela indústria de pesca. Portanto, a quitina pode ser obtida a partir desses resíduos, o que lhe confere baixo custo. Consequentemente a quitosana também tem a vantagem de baixo custo, além de ser biocompatível e biodegradável (Figura 6).

Sua utilização fornece um destino a esses resíduos e reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (ANGELIM *et al.*, 2013).

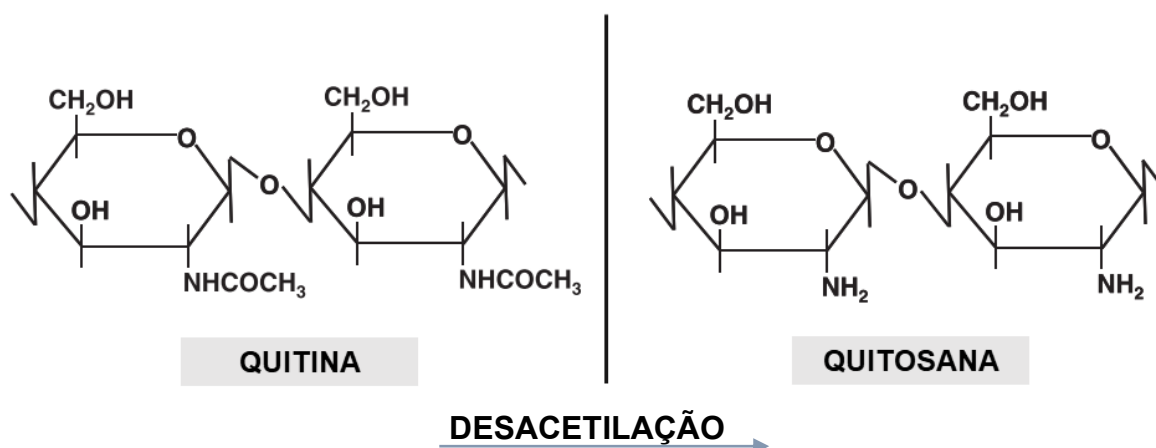
Figura 5 – Tipos de técnicas de imobilização de células e suas principais vantagens quando aplicadas em biorremediação.



A quitosana possui uma estrutura molecular composta de grupos hidroxila (OH) e grupamentos amino (NH_2), sendo solúvel em meio ácido, formando um polímero catiônico, com protonação no grupo amino gerando o íon NH^{3+} , o que confere algumas vantagens na utilização da quitosana como suporte de aprisionamento de microrganismos. Hou *et al.* (2013) relataram que a interação de carga entre as superfícies bacterianas carregadas negativamente e a quitosana carregada positivamente facilita a ligação da célula à superfície da matriz.

Em se tratando de bioaugmentação, o uso de microrganismos imobilizados em suportes poliméricos confere vantagens de sobrevivência das células a fatores abióticos como temperatura, pressão, pH e altas concentrações de sal. Além disso, confere uma vantagem de sobrevivência dessas células na competição com as células bacterianas autóctones de determinado local onde são inseridas. Por isso, a imobilização de microrganismos pode ser utilizada integrada à bioaugmentação, com objetivo de aumentar sua eficácia.

Figura 6- Estrutura da quitina e da quitosana.



Fonte: Adaptado de SINGH; SHITIZ; SINGH, 2017.

3.5 Biossurfactantes em biorremediação

Compostos ativos de superfície ou surfactantes (**surface active agents**) são moléculas anfifílicas que possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial entre duas fases fluidas. São moléculas compostas por uma porção hidrofílica (solúvel em água) que pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica, e uma porção hidrofóbica que é uma cadeia hidrocarbonada (SANTOS *et al.*, 2016). Esses compostos podem produzir emulsões de diferentes tipos. Elas podem ser caracterizadas como pertencentes aos tipos I, II, III e IV, de acordo com Winsor (1954). O tipo I refere-se a sistemas de duas fases que correspondem a emulsões de óleo em água (O/A) coexistindo com uma fase de água. O tipo II, também bifásica, constitui-se de uma emulsão de água em óleo (A/O) coexistindo com excesso de óleo. O tipo III é formado quando o surfactante é concentrado na fase do meio e a emulsão coexiste com as fases de óleo e água formando um sistema trifásico. Já o tipo IV correspondente a uma região monofásica representada por uma emulsão homogênea (BELLOCQ *et al.*, 1984).

Os biossurfactantes podem ter aplicações em diversos setores industriais como farmacêutico, cosmético, alimentício, têxtil, agroquímico, na recuperação avançada de petróleo e também na remediação de ambientes contaminados por substâncias hidrofóbicas (SINGH; HAMME; VAN; WARD, 2007). Por terem uma ampla gama de aplicações, são considerados um dos produtos químicos mais comercializados, porém, essas moléculas que são sintetizadas quimicamente apresentam desvantagens em seu uso, dentre estas destacam-se a não-biodegradabilidade, a

toxicidade ao meio ambiente e sua obtenção a partir de fontes não-renováveis (BANAT, 1995).

Os surfactantes de origem natural, conhecidos como biossurfactantes são moléculas produzidas por alguns organismos, como plantas e seres humanos, mas principalmente por microrganismos como bactérias, leveduras e fungos. Geralmente, a porção hidrofílica dos biossurfactantes é constituída por aminoácidos ou peptídeos; ânions ou cátions; mono-, di- ou polissacarídeos; e a porção hidrofóbica é constituída de ácidos graxos saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Esses compostos apresentam várias vantagens em relação aos surfactantes produzidos quimicamente, como baixa toxicidade, biodegradabilidade, baixa concentração micelar crítica, alta eficiência, diversidade estrutural e capacidade de agir em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade; além de serem obtidos a partir de fontes renováveis (NOGUEIRA FELIX *et al.*, 2019). Essas características fazem dos biossurfactantes uma alternativa potencial ao uso dos surfactantes sintéticos, pois assim como eles, essas moléculas apresentam diversas aplicações na indústria (AMANI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2016).

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua origem microbiana e sua composição química. As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, fosfolipídios, ácidos graxos, lipídios neutros, biossurfactantes poliméricos e biossurfactantes particulados. Os mais conhecidos são os glicolipídeos, que são constituídos de carboidrato ligado a uma cadeia longa de ácido alifático ou ácido hidroxialifático por meio de uma ligação éster. Dentre os glicolipídeos, os mais conhecidos e estudados são os ramnolipídeos, trehalolipídeos e soforolipídeos (JARVIS; JOHNSON, 1949).

Os ácidos graxos, fosfolipídeos e lipídeos neutros podem ser produzidos por bactérias e leveduras quando cultivadas em meio contendo n-alcanos. Seu balanço lipofílico-hidrofílico (HLB) está relacionado ao comprimento da cadeia hidrocarbonada em sua estrutura e possuem uma alta capacidade surfactante em baixas concentrações. Já foi relatada a produção deste tipo de biossurfactante pelo fungo *Aspergillus spp.* e pela bactéria *Thiobacillus thiooxidans* (DESAI; BANAT, 1997). Os biossurfactantes poliméricos são moléculas de alto peso molecular que normalmente contém polissacarídeo e proteína em sua estrutura e, em alguns casos, contém lipídeos. Os mais estudados são: emulsan, liposan, dispersan e manana-lipídeo-

proteína que são conhecidos por sua alta capacidade de formar emulsões. Alguns microrganismos capazes de produzir esses compostos são *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter radioresistens*, *Candida lipolytica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida antarctica* (MUTHUSAMY *et al.*, 2008; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Biosurfactantes particulados são surfactantes que são particionados em vesículas que ficam aderidas à porção extracelular das membranas das células microbianas e auxiliam na captação de compostos hidrofóbicos (VIJAYAKUMA; SARAVANAN, 2015). Os lipopeptídeos e lipoproteínas são moléculas compostas de lipídeos ligados a uma cadeia peptídica e são conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana, além da sua poderosa atividade tensoativa. Dentre os lipopeptídeos, alguns dos mais estudados são surfactinas, iturinas, subtilisina e fengicinas. Eles são produzidos por fungos, leveduras e por diferentes gêneros de bactérias como *Streptomyces*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, sendo os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* os quem têm recebido maior atenção devido à variedade de ambientes em que podem ser encontrados e por possuírem espécies não patogênicas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; MUTHUSAMY *et al.*, 2008).

3.6 Estudos moleculares da dinâmica microbiana do manguezal

As ferramentas de biologia molecular que permitem acessar as informações genéticas de DNA extraído diretamente de amostras ambientais, conhecido como DNA metagenômico, revolucionaram a ecologia microbiana. A metagenômica possibilita o acesso à real diversidade microbiana, superando as limitações impostas por técnicas dependentes de cultivo (DANIEL, 2004; STENUIT *et al.*, 2008). Isso porque a maioria dos micro-organismos nos ambientes não são cultiváveis. Estima-se que os métodos tradicionais de cultivo abrangem apenas 0,1-10% da comunidade microbiana ativa (WHITE; PINKART; RINGELBERG, 1997).

As ferramentas metagenômicas podem auxiliar na melhor compreensão sobre as comunidades microbianas no solo e nas plantas dos manguezais. A compreensão dos microbiomas permite conhecer quem são os membros da comunidade, quais as suas funções e como poderão responder a possíveis distúrbios (CECCON *et al.*, 2019). As estratégias de conservação devem considerar o manguezal como um

sistema, levando em conta todos os processos envolvidos na produtividade e resiliência desse ambiente.

As associações sinérgicas entre os microrganismos ambientais são os principais responsáveis por transformações de contaminantes no ambiente. Por isso, explorar apenas as espécies especializadas em degradar diretamente os compostos contaminantes pode limitar o entendimento dos processos biológicos dedicados à descontaminação. Portanto, as interações entre os microrganismos do microbioma envolvem diferentes vias metabólicas que realizam a biodegradação de forma direta e indireta dos contaminantes (CHICCA *et al.*, 2022).

Ao longo desse processo, ocorre também uma reformulação do solo como matriz pois o processo de biodegradação altera a estrutura da comunidade microbiana (STRICKLAND *et al.*, 2009). Estudos metagenômicos mostram que em diferentes estágios da biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo são realizados por grupos bacterianos diferentes. Além dos microrganismos especializados em utilizar contaminantes como única fonte de carbono, os microrganismos saprófitos tem se mostrado de particular interesse, pois são responsáveis pela mobilização da matéria orgânica. Esta matéria, em matrizes contaminadas, consiste principalmente na fonte de contaminação, e o metabolismo saprófito está envolvido no aumento de sua biodisponibilidade e, eventualmente, na determinação das condições para sua biodegradação por espécies especializadas (BECARELLI *et al.*, 2021).

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Validar um consórcio de bactérias autóctones de manguezal, imobilizado em esferas de quitosana, com e sem adição de biossurfactantes, para acelerar a degradação de hidrocarbonetos em manguezais e monitorar as alterações na estrutura, composição e função do bacterioma utilizando tecnologia de sequenciamento de DNA de nova geração.

4.2 Específicos

- Imobilizar um consórcio de bactérias isoladas de sedimento de manguezal em esferas de quitosana;

- Avaliar a eficácia da bioaugmentação com um consórcio de duas actinobactérias dos gêneros *Gordonia* sp. e *Micrococcus* sp. imobilizadas em esferas de quitosana, em microcosmos de sedimentos de manguezal contaminado com n-hexadecano, por meio da mensuração da atividade desidrogenásica;
- Pesquisar a presença do gene *alkB* nas cepas do consórcio;
- Avaliar a influência da adição de quitosana na comunidade bacteriana de sedimentos de manguezal;
- Avaliar a influência da aplicação do consórcio de bactérias imobilizado em esferas de quitosana, com e sem adição de biossurfactantes, sobre o bacterioma através do sequenciamento massivo do gene 16S rRNA.
- Desenvolver um produto mínimo viável (MVP).
- Depositar o pedido da patente do MVP no INPI.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta e caracterização de sedimentos de manguezal

Foram coletadas amostras do sedimento de manguezal antes do vazamento de óleo que atingiu a costa do nordeste em 2019. O manguezal fica localizado na Área de Proteção Ambiental do Rio Pacoti, em Fortaleza, Ceará. As amostras foram coletadas no mês de abril de 2019, em três pontos, a uma profundidade de 20 cm, com distância de 100 m entre os pontos (*W 38 24 54.029 S 3 49 17.940*; *W 38 24 57.924 S 3 49 18.264*; *W 38 25 1.400 S 3 49 19.000*) com ajuda de um amostrador de solo, ao longo de uma área com predominância de *Rhizophora mangle*. O sedimento foi caracterizado quanto às suas características físico-químicas no laboratório de solos da Universidade Federal do Ceará (Campus do Pici).

5.2 Avaliação das cepas do consórcio quanto a capacidade de utilizar hexadecano como única fonte de carbono

As cepas utilizadas nesse estudo são Actinobactérias pertencentes aos gêneros *Gordonia* sp. HEX 5 e *Micrococcus* sp. HEX 6. Ambas provenientes de sedimentos do manguezal cronicamente contaminado com petróleo localizado na baía de Todos os Santos (BA- Brasil). Essas cepas foram anteriormente isoladas de uma área próxima à refinaria da Petrobras por meio da técnica de enriquecimento em meio mineral contendo hexadecano como fonte de carbono por ANGELIM *et al.*, 2013.

Para avaliar a capacidade de crescimento utilizando hexadecano como fonte de carbono, as cepas HEX 5 e HEX 6 foram inoculadas na proporção de 10% em meio-mineral contendo K_2HPO_4 (1,0 g); KH_2PO_4 (1,0 g); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,026 g), $(NH_4)_2SO_4$ (1,0 g) (Difco, Sparks, MD, EUA) por litro. Após esterilização a 110°C por 30 minutos em autoclave, o meio foi suplementado com uma solução de micronutrientes 0,1% (v/v) contendo EDTA (2,5 g); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (10,95 g); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (5,0 g); $MnSO_4 \cdot H_2O$ (1,54 g); $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,392 g); $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,25 g); $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (0,177 g) por litro, previamente esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μm (Millipore, EUA). Foi então adicionado o hexadecano (Sigma-Aldrich) previamente filtrado em membrana de 0,22 μm , na concentração de 1% (v/v). A cada duas horas foram medidas as absorbâncias das culturas, e a cada seis horas foi realizada contagem de células viáveis.

5.3 Extração do DNA genômico das cepas HEX 5 e HEX 6 para detecção do gene *alkB*

O DNA das cepas HEX 5 e HEX 6 foi extraído pela metodologia de termólise (SÁ *et al.*, 2013). O DNA extraído foi quantificado em Nanodrop® ND-1000 a 260 nm (Wilmington, DE, EUA) e analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. O DNA total foi submetido à amplificação do fragmento do gene *alkB* por reação em cadeia da polimerase (PCR), usando os iniciadores *alkBF* (5'-ATC AAYRCVGCVCAYGARYTVGGBBCACAAG-3') e *alkBR* (5'-SGGRTTCGCRTGRTGRTCRCTGTGNSGYTG-3') (SHEN *et al.*, 2010). As reações de PCR foram realizadas com até 200 ng de DNA molde, 1 X de GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 μM de cada iniciador e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. As PCRs foram realizadas em um termociclador programado para 5 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s 60 °C e 60 s a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 7 min a 72 °C. Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com SYBR® Safe DNA.

5.4 Imobilização do consórcio de duas Actinobactérias e quantificação da densidade de células imobilizadas

O gel de quitosana foi preparado dissolvendo-se quitosana na proporção 3% (m/v) em ácido acético 1% (v/v) pH 4,0. As cepas foram cultivadas separadamente em

meio TGE com 2% de NaCl por 24 h. As absorbâncias das culturas foram ajustadas para 0,1 a 600 nm e inoculadas em erlenmeyer na proporção de 1% v/v para produção de biomassa. Após 72 h de crescimento, a biomassa de cada cultura foi recuperada por centrifugação a 8000 x g por 10 minutos. Os precipitados foram lavados duas vezes com solução NaCl 0,9% m/v e posteriormente ressuspensionado em 500 µL de NaCl 0,9% m/v para serem homogeneizados com os 100 mL do gel de quitosana previamente preparado, a fim de se obter uma densidade de células equivalente a 2×10^7 UFC/mL de gel de quitosana. A solução de quitosana com microrganismos foi gotejada usando uma seringa em solução de tripolifosfato (TPP) 1% (m/v), pH 9,0, para formação das esferas e aprisionamento das células bacterianas. Posteriormente, as esferas produzidas foram lavadas três vezes em 200 mL de solução K_2HPO_4 0,15 M pH 8,0 (HSIEH *et al.*, 2008). Para verificar o sucesso da imobilização, 4 g de esferas foi macerada para estimar o número de células viáveis.

5.5 Ensaio de biorremediação de sedimentos de manguezal em microcosmos

Microcosmos foram montados em tubos falcon estéreis de 50 mL, contendo 2 g de sedimentos de manguezal recém-coletado e peneirado em malha de 2 mm. Os tubos foram divididos em 7 grupos de tratamento, descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições experimentais dos microcosmos de sedimento de manguezal.

Condição	Composição
S	Sedimento
SC	Sedimento + 179 mg de esferas de quitosana <u>sem</u> microrganismos
SH	Sedimento + hexadecano (10 g/kg)
SCH	Sedimento + hexadecano (10 g/kg) + 179 mg esferas de quitosana <u>sem</u> microrganismos
SSH	Sedimento + hexadecano (10 g/kg) + biossurfactante

SMH	Sedimento + hexadecano (10 g/kg) + 179 mg de esferas de quitosana com consórcio microbiano imobilizado (5×10^7 UFC/g)
SMSH	Sedimento + hexadecano (10 g/kg) + 179 mg de esferas de quitosana com consórcio microbiano imobilizado (5×10^7 UFC/g) + biossurfactante

Os microcosmos ficaram a temperatura ambiente ($\approx 28^\circ\text{C}$) e o experimento teve duração de 60 dias. Decorridos 30 dias de experimento houve um reforço do contaminante hexadecano, na mesma proporção de 10 g/kg em todas as replicatas dos grupos que continham hexadecano (SH, SSH, SCH, SMH e SMSH). As amostragens foram realizadas nos tempos de 0, 3, 12, 21, 30, 33, 42, 51 e 60 dias. No total, foram utilizados 336 microcosmos, pois cada tempo de análise compreendeu 6 microcosmos por condição, dos quais 4 foram utilizados no teste da atividade desidrogenásica e 2 foram armazenados sob refrigeração para extração de DNA.

O biossurfactante utilizado foi produzido e fornecido pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia. No experimento ele foi aplicado utilizando a concentração igual a CMC (concentração micelar crítica). A quantidade de hexadecano adicionada aos microcosmos foi escolhida com base em níveis de contaminação típicos de derramamentos de petróleo bruto já relatados em ambientes aquáticos e com base em quantidades possíveis de serem degradadas dentro do período de incubação deste estudo. Os dados obtidos foram reunidos em gráficos por meio do programa *GraphPad Prism 6.0*.

5.6 Atividades desidrogenásica

A atividade desidrogenásica foi determinada segundo metodologia de LENHARD, 1956, modificada por THALMANN, 1968 e ALEF, 1995. Em cada microcosmo contendo 2 gramas de solo e o respectivo tratamento, foram adicionados 5 mL de uma solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 2% em tampão Tris HCl pH 7,0, previamente esterilizado por filtração em membrana de $0,22 \mu\text{m}$. Após 24 horas, acetona foi adicionada aos tubos para interromper a reação enzimática e, após a homogeneização, foi realizada centrifugação e a absorbância do sobrenadante foi

medida a 485 nm em espectrofotômetro. Uma curva padrão foi construída e utilizada para quantificar os valores de trifeniltetrazolio formazan formado em cada amostra.

5.7 Extração de DNA dos microcosmos

Foram selecionadas as amostras correspondentes aos tempos em que a atividade desidrogenásica foi mais significativa (T12, T30, T33 e T60) para realização da extração de DNA genômico total dos microcosmos, em duplicata. Foi utilizado o kit comercial *DNeasy PowerSoil Kit* (MO BIO, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Os DNAs das amostras foram quantificados em NanoDrop e armazenadas a -20 °C até o uso.

5.8 Sequenciamento do gene 16S rDNA dos microcosmos

O DNA das amostras correspondes aos tempos (T12; T30; T33 e T60) foi utilizado para amplificação do fragmento da região V4 do rRNA 16S por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR) usando os iniciadores universais específicos 515F-Y e 806R (Parada *et al.*, 2016; Caporaso *et al.*, 2011). A região do 16S rRNA foi amplificada em uma reação de 30 µL onde foram adicionados 2 µL de DNA (5 ng/µL), 0,75 µL de cada iniciador (10 µM), 15,0 µL de 2X KAPA *HiFi Ready Start Mix* e 9,5 µL de água ultrapura livre de nuclease (Promega, Madison, WI, USA).

As reações foram incubadas no termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient Thermal Cyclor (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) usando o seguinte programa: desnaturação inicial do DNA a 95 °C por 3 min, seguidos por 35 ciclos a 98 °C por 20 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, com extensão final a 72 °C por 5 min. Os amplicons foram verificados em gel de agarose a 2% (m/v) e purificados usando Ampure XP *beads* (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Após a purificação, os amplicons foram submetidos a nova PCR para inserção dos adaptadores do sequenciamento Illumina usando o kit Nextera XT Index (Illumina, San Diego, CA, EUA) e em seguida, novamente purificados usando Ampure XP *beads*.

A concentração de cada biblioteca foi determinada usando o fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e em seguida, normalizada de acordo com o protocolo para a preparação da biblioteca de sequenciamento (Illumina, San Diego, CA, EUA). Concentrações equimolares de cada biblioteca foram reunidas em um único tubo formando um *pool* que foi diluído e desnaturado. O sequenciamento foi realizado na Central de Genômica e Bioinformática (<https://cegenbio.ufc.br/pt/>) da

Universidade Federal do Ceará, usando a plataforma Illumina MiSeq (Illumina, EUA) e o *kit* de reagentes Miseq V2-300 ciclos, de acordo com as instruções do fabricante.

5.8.1 Processamento de dados

Inicialmente, as sequências brutas foram desmultiplexadas usando Cutadapt v1.8 (MARTIN, 2011) no modo *paired-end*, e a qualidade das leituras foi avaliada usando FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2012) e vsearch v2.10.4 (ROGNES *et al.*, 2016). As análises subsequentes foram realizadas no ambiente R v3.6.3 (R CORE TEAM, 2020), seguindo o pipeline do pacote DADA2 v1.14.1 (CALLAHAN *et al.*, 2016) para obter uma tabela de *amplicon sequence variant* (ASVs; sequências diferindo em apenas um nucleotídeo) (CALLAHAN *et al.*, 2017). A atribuição de taxonomia e a remoção de sequências não bacterianas foram realizadas contra o banco de dados de referência SILVA (versão 132) (CALAHAN, 2018).

5.8.2 Análise estatística

Estimativas de diversidade alfa foram calculados, testados e normalizados pelo teste de Shapiro-Wilk. Como a diversidade de Shannon e a uniformidade de Simpson eram paramétricas, uma análise de variância unilateral e os testes *posthoc* de diferença significativa de Tukey (HSD) foram usados para comparações múltiplas de médias em um intervalo de confiança de 95%. Para Chao1 e ASVs observadas, usamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O agrupamento NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) a nível de gênero foi usado para visualizar as diferenças na estrutura da comunidade entre os diferentes tratamentos usando a matriz de abundância transformada de Hellinger a nível de ASV e dados rarefeitos.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização dos sedimentos

Sedimentos de manguezal do estuário do rio Pacoti utilizado neste estudo foram caracterizados como tipicamente alcalino, salino-sódico (condutividade elétrica $\geq 4,0$ dS/m, pH $\approx 8,2$), com 1,2% de matéria orgânica (12 g/kg) e com teor de carbono em torno de 0,7%. A Tabela 2 mostra o resultado completo da análise desses sedimentos.

Tabela 2 - Caracterização do sedimento de manguezal utilizado neste trabalho.

Sedimento Manguezal				
C.E	=	pH		8,2
		C.E (dS/m)		8,0
		Complexo sortivo (cmolc _c /Kg)	Ca ²⁺	15,60
			Mg ²⁺	2,30
			K ⁺	0,75
			S	36,5
			T	36,5
			V(%)	100
			PST	49
			Na ⁺	17,89
		C (g/kg)		6,96
		N (g/kg)		0,72
		C/N		10
		M O (g/kg)		12,00
		P assimilável (g/kg)		34
Salinidade		47		
Silte/Argila (%)		26,4		

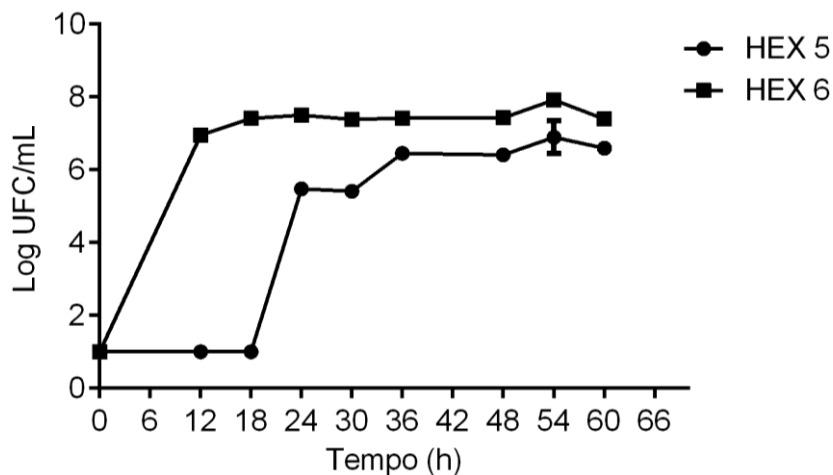
Condutividade elétrica; **C/N** = razão carbono nitrogênio; **M O** = Matéria orgânica; **V%** = saturação por bases; **PST** = porcentagem de sódio trocável.

6.2 Avaliação das cepas do consórcio quanto a capacidade de utilizar hexadecano como única fonte de carbono

A curva de crescimento em hexadecano está mostrada na Figura 7. Ambas as cepas HEX 5 e HEX 6 cresceram em meio mineral contendo hexadecano como única fonte de carbono. HEX 6 atingiu densidade óptica de 2,2, equivalente a $2,5 \times 10^7$ UFC/mL, enquanto HEX 5 atingiu densidade óptica de 1,6, equivalente a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. A fase de adaptação (fase lag) foi mais longa para HEX 5 do que para HEX 6, que entrou na fase log de crescimento após 12 h de cultivo, enquanto a HEX 5 entrou na fase log após 22 h de cultivo. HEX 5 atingiu a fase estacionária após 52 h

de cultivo, e a HEX 6 após 44 h de cultivo. A pureza das culturas foi verificada através de cultivo em placa.

Figura 7 - Curva de crescimento de HEX 5 e HEX 6 em meio mineral contendo 1% de hexadecano como única fonte de carbono.



6.3 Detecção do gene *alkB*

A partir da eletroforese em gel de agarose 2% foi possível confirmar que HEX 5 carrega o gene *alkB* através da visualização da banda do fragmento de 558 pb detectada no gel de eletroforese. Não foi detectado a presença do gene *alkB* na cepa HEX 6.

Figura 8 - Detecção do gene *alkB* nas cepas HEX 5 e HEX 6.



M representa a raia onde foi aplicado o marcador de peso molecular. *Gordonia* sp. HEX 5 (raias 1 e 2) e *Micrococcus* sp. HEX 6 (raias 3 e 4). Foi utilizado SYBr Safe para coloração das bandas e visualização no transiluminador.

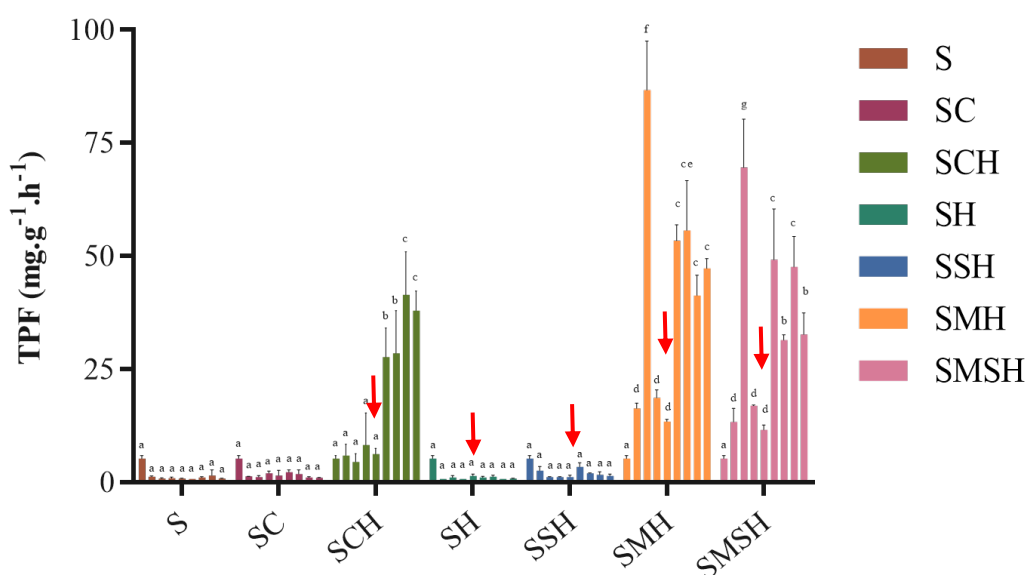
6.4 Avaliação da eficiência do processo de imobilização do consórcio de bactérias

A eficiência da imobilização do consórcio de bactérias em quitosana foi avaliada através da contagem de células viáveis. Para isso, as esferas foram maceradas, submetidas a diluições seriadas e inoculadas em placas de meio ATGE contendo 2% de NaCl. Após o período de incubação constatou-se a viabilidade do consórcio pelo crescimento das colônias características de cada estirpe. A eficiência da imobilização foi verificada pelas contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas, $1,32 \times 10^8$ UFC/g de HEX 5 e $2,45 \times 10^8$ UFC/g de HEX 6.

6.5 Ensaio de biorremediação de sedimentos de manguezal realizado em microcosmos

A atividade metabólica dos microcosmos foi analisada pela mensuração da atividade desidrogenásica. Os resultados estão mostrados nas Figuras 3 e 4. Foi realizada uma análise de variância pelo método *two-way* ANOVA, com o pós-teste de Tukey a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Figura 9- Atividade desidrogenásica expressa em concentração do produto TPF ($\mu\text{g TPF.g}^{-1}$) nos determinados tempos de análise, agrupados por tratamento.



Legenda: Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes em relação aos demais. Para cada grupo, cada barra representa um tempo de análise (T0, T3, T12, T21, T30, T33, T42, T51 e T60). Setas vermelhas indicam o dia em que houve o reforço do contaminante (T30). S: Sedimento; SC: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; SCH: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); SH: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); SSH:

Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); SMH: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); SMSH: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

O grupo controle (**S**) não apresentou variação significativa de atividade desidrogenásica ao longo do experimento. Os grupos **SH**, **SC** e **SSH** também não responderam aos componentes externos adicionados aos microcosmos. A permanência da taxa metabólica em níveis basais nos grupos **SH** e **SSH** demonstra que a microbiota autóctone do sedimento não responde rapidamente, isoladamente, à contaminação com hexadecano, nem mesmo quando o biossurfactante está presente.

O grupo **SCH** manteve sua atividade metabólica sem variação até 30 dias de experimento. No entanto, 3 dias após o segundo derrame do contaminante, esse grupo apresentou aumento significativo em sua atividade desidrogenásica, que de $6,25 \pm 1,3 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ no dia 30, subiu para $31,42 \pm 6,4 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ no dia 33. A partir de então, esse valor aumentou até $41,49 \pm 9,47 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ no 51º dia (**T51**) e manteve-se alto até o final dos 60 dias de experimento.

O grupo com consórcio microbiano imobilizado em quitosana, **SMH**, apresentou um aumento significativo da sua atividade metabólica em relação ao tempo 0 e em relação aos grupos controle **S**, **SH**, **SC** e **SCH** já com três dias após o início do experimento. Em **T3**, esse valor chegou a $16,37 \pm 1,1 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$. Em **T12**, o valor da atividade aumentou para $86,70 \pm 10,8 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$. Em **T30**, a atividade de $13,45 \pm 0,4 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, ainda é significantemente maior que **T0** e maior do que nos grupos **S**, **SH**, **SC** e **SCH**. Em **T33**, 3 dias após o segundo derrame, a atividade desidrogenásica aumenta novamente para $53,42 \pm 3,5 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ e mantém-se aproximadamente constante até o último dia de experimento, a $47,24 \pm 2,2 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$.

O grupo **SMSH** teve um padrão de atividade metabólica semelhante ao grupo **SMH**. Em **T3**, a atividade desidrogenásica era de $13,38 \pm 2,9 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, valor significativamente maior que **T0** e do que os valores encontrados nos grupos **S**, **SH**, **SC** e **SCH**. Em **T12**, o valor aumenta ainda mais, atingindo $69,65 \pm 10,6 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$. Ainda assim, esse valor é mais baixo e significativamente diferente do que o valor de **SMH** no mesmo tempo de análise. Três dias após a adição do segundo derrame, em **T33**, há um novo aumento na atividade para $49,22 \pm 11,27 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, valor que não difere estatisticamente do encontrado no grupo **SMH**. No entanto, em **T42** a atividade metabólica diminui para $31,46 \pm 1,1 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, que corresponde à metade do valor

encontrado para **SMH**, e estatisticamente próximo ao valor encontrado em **SCH**. Em **T60**, o valor fica em torno de $32,69 \pm 4,7 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, menor que o valor do grupo **SMH** e mais uma vez próximo ao valor encontrado no grupo **SCH**.

Após o reforço do contaminante, no dia 30, nota-se um aumento expressivo da atividade enzimática dos grupos **SCH**, **SMH** e **SMSH**, no dia **T33**. Os três grupos continuaram com alta atividade até o fim do experimento, com algumas oscilações. Percebe-se que o grupo **SCH** apresentou um aumento progressivo de sua atividade enzimática até o fim dos 60 dias, enquanto os grupos **SMH** e **SMSH** apresentaram uma leve diminuição. Vinte e um dias após o reforço do contaminante, em **T51**, há uma diminuição da atividade de **SMH** e **SMSH**, semelhante ao padrão observado nos primeiros 21 dias de experimento, enquanto **SCH** atinge seu maior pico de atividade. No final do experimento, em **T60**, o grupo **SMH** mantém sua atividade, juntamente com **SCH**, com valores significativamente semelhantes, enquanto **SMSH** demonstra uma queda de atividade metabólica.

6.6 Sequenciamento do gene 16S rDNA dos microcosmos

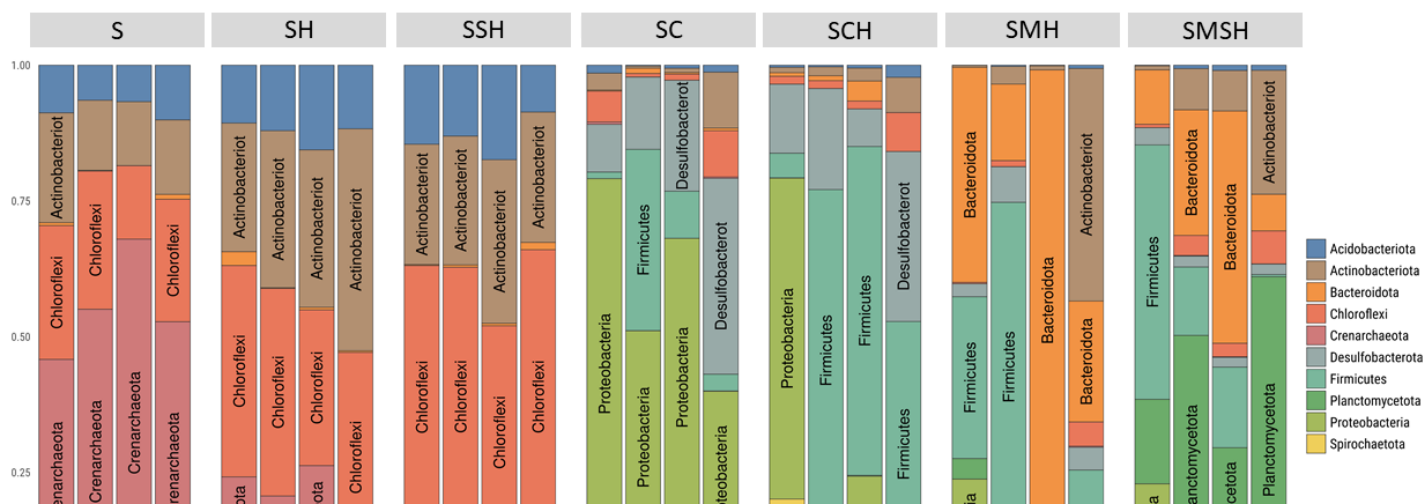
Com base nos gráficos de abundância relativa (Figura 10) referente ao nível de filo (excluindo abundâncias menores que 5%), é possível observar que os filos predominantes variam de acordo com o tratamento. Nove filos predominam de forma geral nos grupos: Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Firmicutes, Actinobacteria, Chloroflexi, Crenarqueota, Acidobacteria e Desulfobacteria. Nos grupos S, SH e SSH, é possível visualizar maior predominância dos filos Chloroflexi, Actinobacteria e Crenarqueota. Nos grupos contendo quitosana (SC e SCH) é possível visualizar maior abundância relativa dos outros filos: Bacteroidetes, Desulfobacteria e Spiroqueta. E os grupos contendo o consórcio microbiano (SMH e SMSH) têm maior abundância relativa de Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Planctomicetes.

É possível observar que apesar de cada tratamento apresentar enriquecimento de determinados táxons, existe um *core* de filos de microrganismos presentes nos sedimentos utilizado nos microcosmos.

A nível de família (Figura 11) foi possível observar a presença de *Alcanivoracaceae* nos grupos SH (39% em T33) e SSH (40% em T33). Essa família também está presente no solo pristino **S** (1%), porém em uma abundância menor.

Portanto, a exposição da microbiota nativa do manguezal à presença de hexadecano promoveu o enriquecimento dessa família.

Figura 10 - Abundâncias relativas de microrganismos a nível de filo encontradas nos microcosmos dos diferentes grupos. Na imagem, apenas táxons com abundância relativa > 5%.



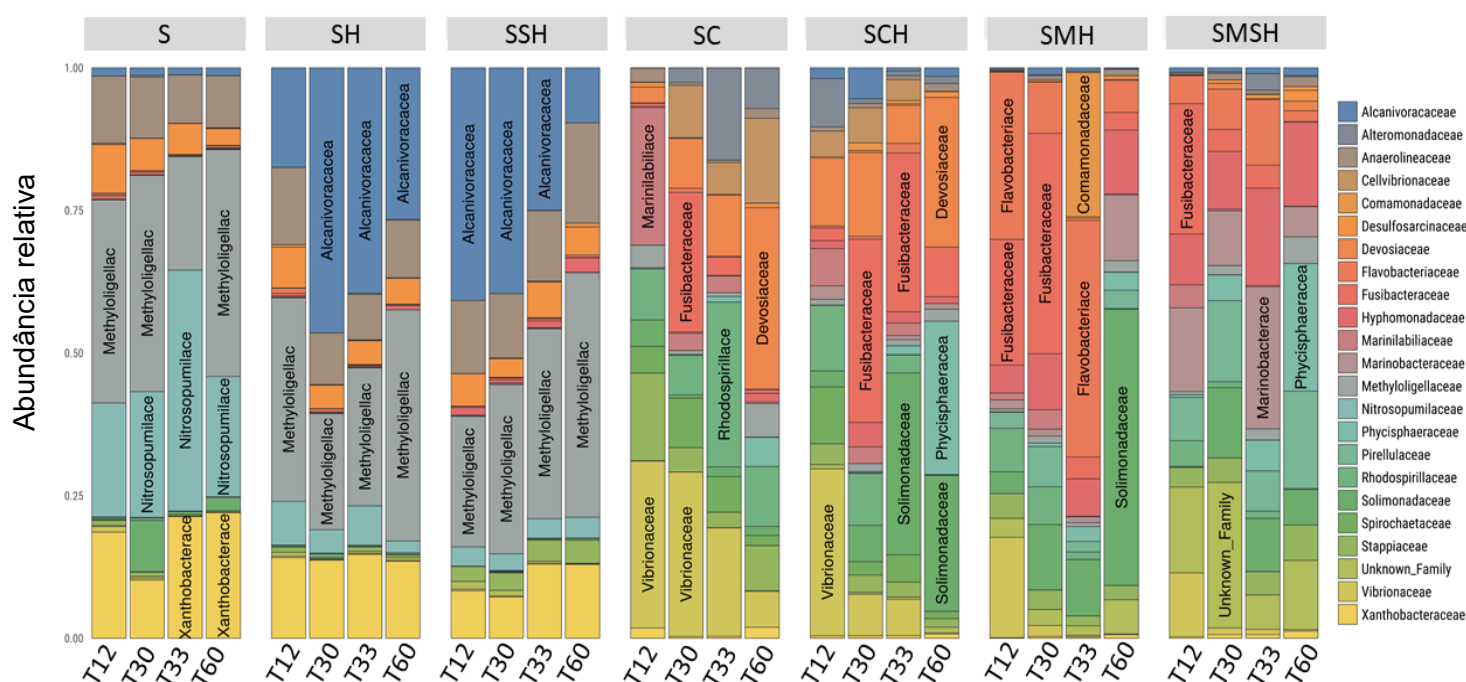
Legenda: Para cada grupo, cada barra representa um tempo de análise (T12, T30, T33 e T60). O reforço do contaminante foi realizado em T30. S: Sedimento; SC: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; SCH: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); SH: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); SSH: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); SMH: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); SMSH: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

As famílias *Methylobacteriaceae* e *Xantobacteriaceae* também têm alta abundância relativa nos grupos S, SH e SSH, principalmente em T33. Já no grupo SMH, houve um aumento da abundância da família *Solimonadaceae* ao longo do tempo, atingindo 48% da população em T60. Também é possível observar a presença da família *Fusibacteriaceae* (22 %) até 30 dias de experimento. Após a reaplicação do contaminante, houve redução dessa família para 3 % e aumento da abundância de *Flavobacteriaceae* de 29% em T12 para 41% em T33. Em SMSH, também ocorreu uma diminuição da abundância da família *Fusibacteriaceae* (23% para <1%), enquanto houve um aumento da família *Hyphomonadaceae* (<1% para 15%), *Marinobacteraceae* (<1% para 5%) e *Phycisphaeraceae* (<1% para 22%). Observou-se aumento da abundância relativa de *Devosiaceae* em SC (2% - 32%) e SCH (11 - 26%) em T60. Em SCH houve aumento de *Fusibacteriaceae* após a reaplicação do contaminante para 28% da população. Após 60 dias esse valor cai para 8%. Em SCH também houve aumento de *Fusibacteriaceae* (<1% - 28%) após a reaplicação do

contaminante, acompanhando do enriquecimento de *Phycisphaeraceae* (<1% - 26%) e *Solimonadaceae* (2% - 23%), enquanto houve uma redução de *Vibrionaceae* (29% - <1%).

O grupo S apresenta maior abundância dos gêneros *Candidatus Nitrosopumilus* (42%), *Methyloceanibacter* (29%) e *Pseudolabrys* (21%). Os grupos SH e SSH apresentam, respectivamente, maior abundância dos gêneros *Methyloceanibacter* (41% e 25%), *Ketobacter* (42% e 45%) e *Pseudolabrys* (15% e 16%). *Ketobacter* é o principal representante da família Alcanivoracaceae presente nos grupos SH e SSH. Portanto, há uma correlação positiva entre esse gênero e a presença de hexadecano no meio.

Figura 11 - Abundâncias relativas de microrganismos a nível de família encontradas nos microcosmos dos diferentes grupos tratados. Na imagem, apenas táxons com abundância relativa > 5%.

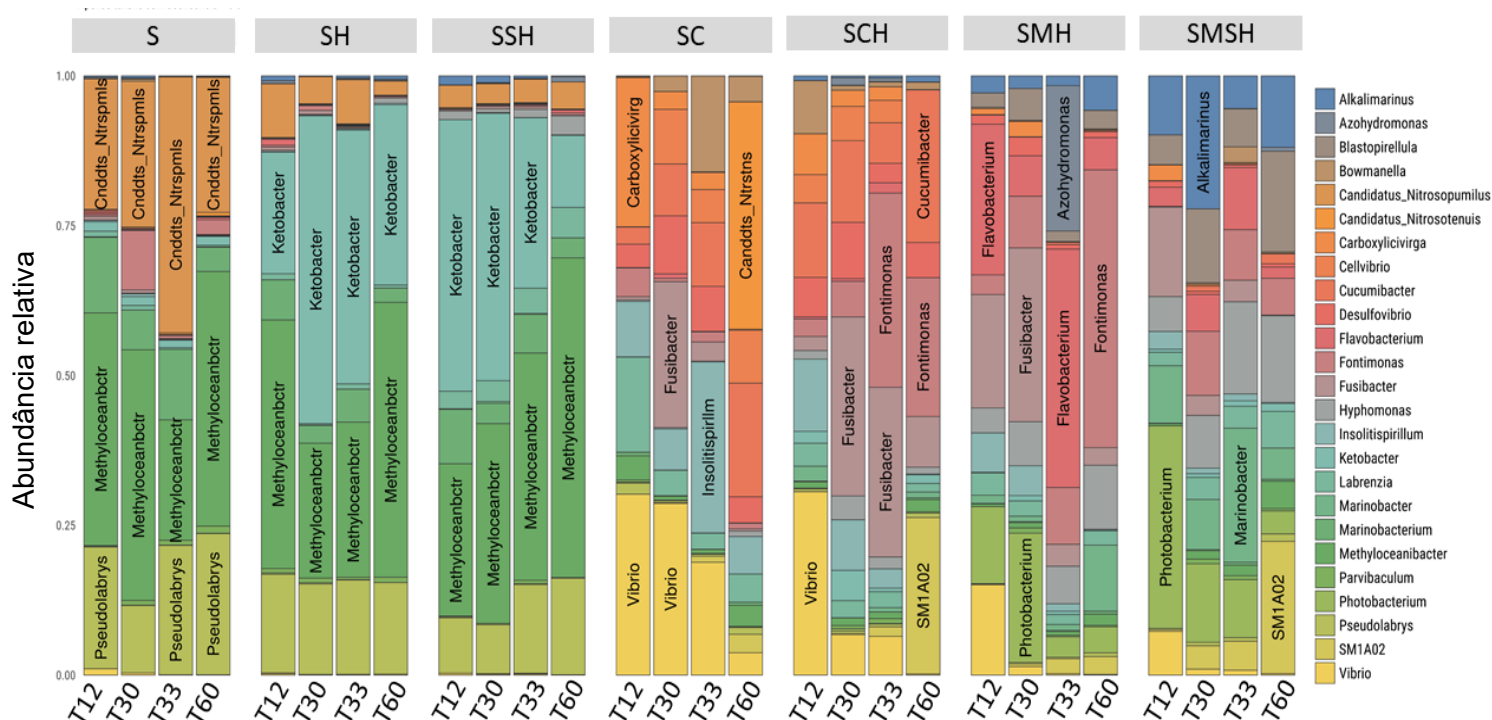


Legenda: Para cada grupo, cada barra representa um tempo de análise (T12, T30, T33 e T60). O reforço do contaminante foi realizado em T30. S: Sedimento; SC: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; SCH: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); SH: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); SSH: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); SMH: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); SSMH: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

Os principais gêneros observados (Figura 12) em SMH são: *Flavobacterium* (39%), *Fusibacter* (19%) e *Photobacterium* (13%). Após o reforço de contaminante, *Azohydromonas* e *Fontimonas* tiveram aumento em suas abundâncias relativas para

24% e 9% respectivamente. Já no grupo SSMH, apesar de apresentar um *core* de microrganismos parecido com de SMH, houve também uma predominância maior dos grupos *Marinobacter* (22%), *Hyphomonas* (15%) e *Alkalimarinus* (11%). Os gêneros que predominaram em SC e SCH foram similares, ambos com a presença abundante de *Vibrio*, *Insolitispirillum*, *Fusibacter*, *Fontimonas* e *Carboxylicivirga*. Ao longo do tempo, houve uma diminuição da abundância de *Vibrio* nesses grupos, de 30% para 1%.

Figura 12 - Abundâncias relativas de microrganismos a nível de gênero encontradas nos microcosmos dos diferentes grupos tratados. Na imagem, apenas táxons com abundância relativa > 5%.



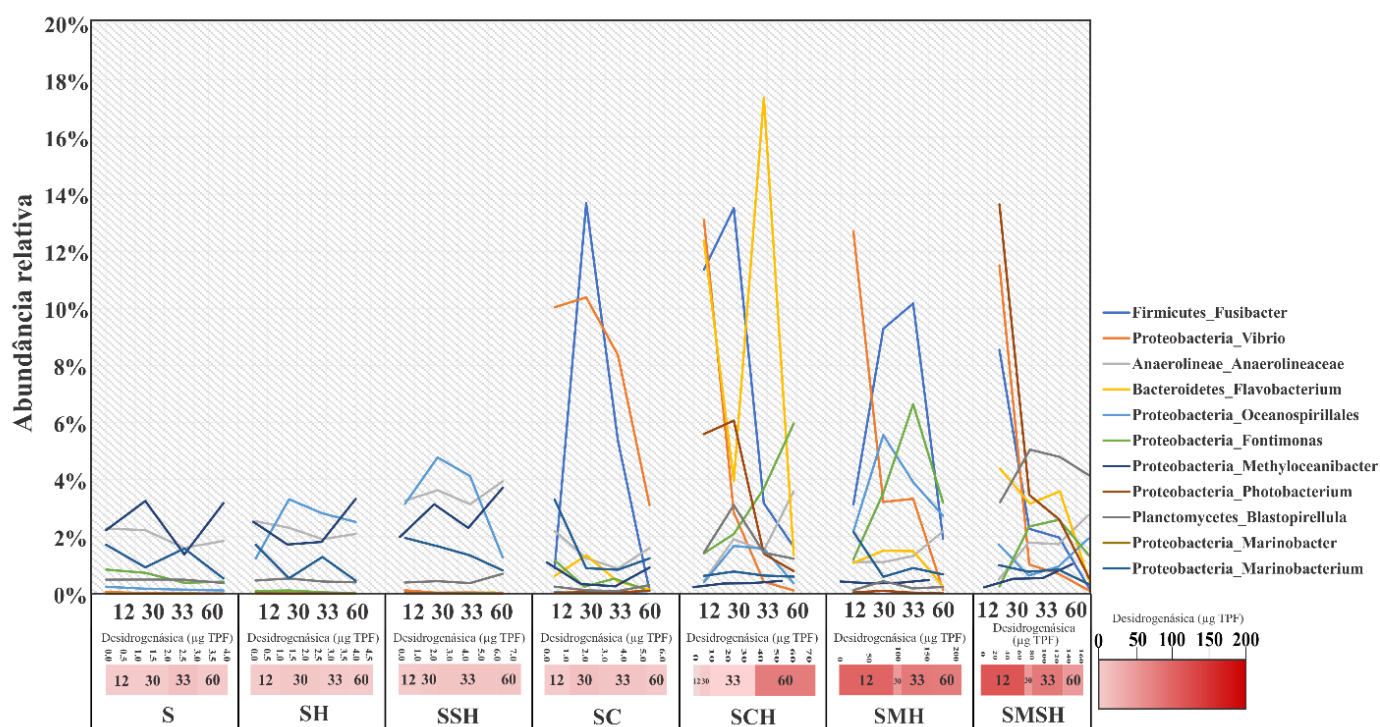
Legenda: Para cada grupo, cada barra representa um tempo de análise (T12, T30, T33 e T60). O reforço do contaminante foi realizado em T30. S: Sedimento; SC: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; SCH: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); SH: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); SSH: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); SMH: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); SSMH: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

6.7 – Relação entre abundâncias relativas de microrganismos e a atividade desidrogenásica.

A figura 13 ilustra a variação de táxons mais representativos, a nível de família e de gênero, nos diferentes tempos. Em SC, o aumento mais significativo foi de

Fusibacter em T30. Além de *Fusibacter*, *Vibrio* também teve alta abundância relativa nesse tempo. Até T60, a abundância desses dois grupos caiu gradativamente. No grupo SCH, a presença do hexadecano promoveu maior dinâmica microbiana. Com diferentes táxons prevalecendo nos diferentes tempos. A partir de T33, quando houve aumento significativo da atividade DHase, foi possível verificar alta abundância de *Flavobacteria*, enquanto houve uma queda na abundância de *Fusibacter*. No grupo SMH, destaca-se a alta abundância de *Vibrio* detectada em T12, momento de alta DHase, essa abundância cai enquanto há aumento da abundância de *Fusibacter* e *Fontimontas* em T33, quando há um novo pico de DHase. Em SMSH, há alta abundância de *Photobacterium*, *Vibrio* e *Fusibacter* em T12, no pico de DHase. Em T30, a abundância relativa desses grupos foi reduzida.

Figura 13 - Relação entre as abundâncias relativas de microrganismos e a atividade desidrogenásica mensurada no respectivo tempo de análise. Na imagem, apenas táxons a nível de família e de gênero detectados com abundância relativa > 5%.



Legenda: A intensidade da atividade desidrogenásica está indicada abaixo do gráfico pela intensidade da cor vermelha nos respectivos tempos de análise. Para cada grupo, cada ponto representa um tempo de análise (T12, T30, T33 e T60). S: Sedimento; SC: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; SCH: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); SH: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); SSH: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); SMH: Sedimento + esferas de quitosana com microrganismos imobilizados +

hexadecano (10 g/kg); SSMH: Sedimento + esferas de quitosana com microrganismos imobilizados + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

De forma geral, os principais táxons detectados nos momentos de maior DHase detectada nos diferentes grupos foram: *Fusibacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Fontimonas*, *Oceanospirilaes*, *Marinobacterium* e *Fotobacterium* (Tabela 3). Claramente a resposta microbiana nos grupos em que houve a adição do consórcio, foi diferente da observada nos outros grupos, onde também houve maiores valores de DHase detectadas.

Tabela 3 - Principais táxons detectados nos microcosmos e suas funções já relatadas na literatura.

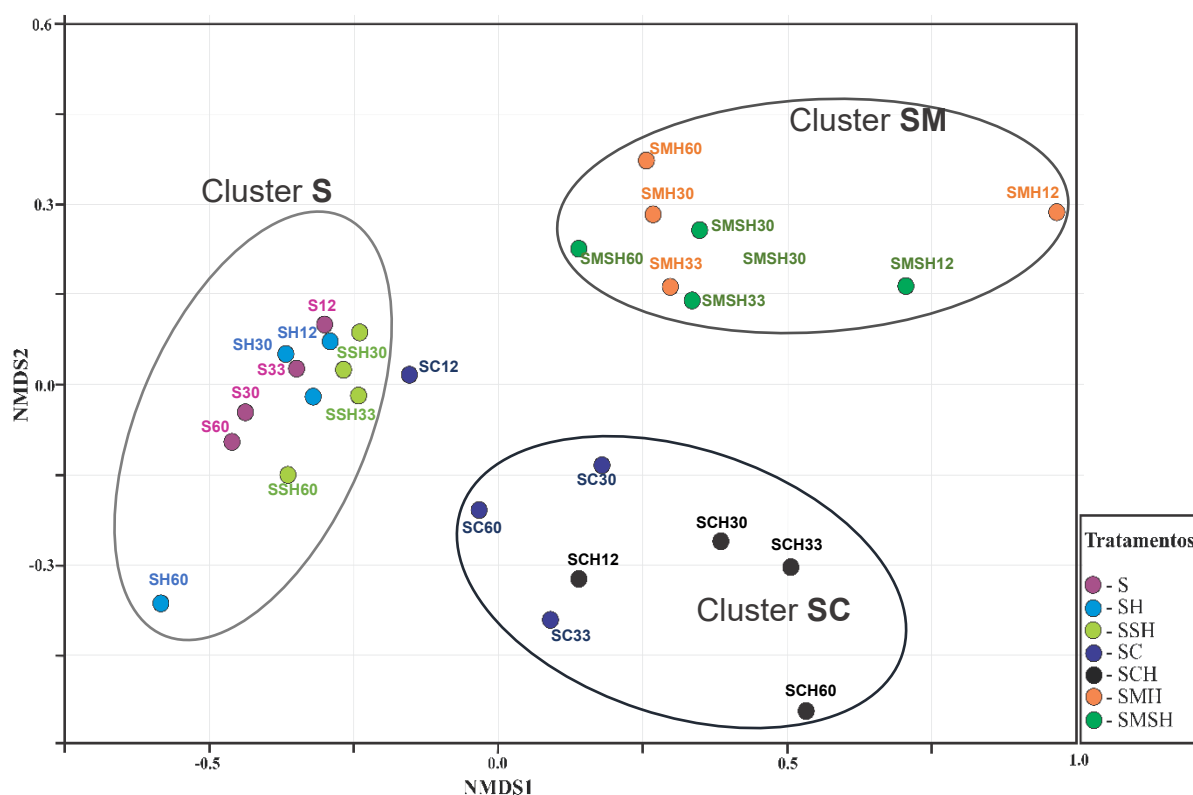
Táxon	Funções	Referência
<i>Ketobacter</i>	Metabolismo de hidrocarbonetos	YAKIMOV <i>et al.</i> , 2019 KIM <i>et al.</i> , 2018
<i>Fusibacter</i>	Ciclo do carbono, redutores de tiosulfato	RAVOT <i>et al.</i> , 2015
<i>Flavobacterium</i>	Metabolismo de hidrocarbonetos	RIBICIC <i>et al.</i> , 2018a; MILLER <i>et al.</i> , 2019
<i>Fontimonas</i>	Decomposição de poluentes químicos e hidrocarbonetos	ZHOU; LAI; LI, 2014
<i>Oceanospirilaes</i>	Metabolismo de hidrocarbonetos	ATLAS <i>et al.</i> , 2015 JOYE <i>et al.</i> , 2016
<i>Marinobacterium</i>	Metabolismo de hidrocarbonetos	SATOMI; FUJII, 2014.
<i>Fotobacterium</i>	Produtoras de compostos ativos de superfície, quimioorganotróficos	MORALES-GUZMÁN <i>et al.</i> , 2021; MUTHUSAMY <i>et al.</i> , 2008; URBANCZYK; AST; DUNLAP, 2011
<i>Methyloceanibacter</i>	Ciclo de compostos contendo 1 carbono, metilotróficos	TAKEUCHI <i>et al.</i> , 2014 JIN <i>et al.</i> , 2012; PATEL, 1982; WANG, 2015
<i>Vibrio</i>	Ciclo do carbono, degradam matéria orgânica	CABRAL <i>et al.</i> , 2018
<i>Desulfobacter</i>	Ciclo do enxofre, degradam hidrocarbonetos	LIANG <i>et al.</i> , 2007 ROSENBERG <i>et al.</i> , 2014

A análise das comunidades microbianas no solo dos microcosmos foi realizada utilizando a análise NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) (Figura 14). Houve uma significativa variação das comunidades de microrganismos dentro dos grupos comparados, e essa diferença está relacionada ao tipo de tratamento que cada microcosmo recebeu. Os agrupamentos observados foram: S, SH e SSH (cluster S);

SC e SCH (Cluster SC); e os grupos com adição do consórcio, SMH e SMSH (Cluster SM). No entanto, é possível visualizar que o SC, no tempo 12 (Figura 14) ficou próximo ao cluster de S. Isso corrobora com a análise de abundâncias relativas, onde a comunidade microbiana desse grupo sofreu alterações significativas em sua estrutura detectadas apenas em T30. A atividade metabólica nesse grupo não sofreu alteração ao longo do tempo, demonstrando uma resposta mais lenta à adição apenas da quitosana, o que se refletiu também na velocidade de reestruturação da comunidade microbiana.

O cluster S reúne o grupo sem tratamento (**S**) aos grupos SH e SSH, o que corrobora com a análise de abundância relativa, onde as comunidades desses grupos foram similares. Esses grupos também não tiveram uma resposta de atividade desidrogenásica significativa, o que demonstra sua similaridade em termos metabólicos.

Figura 14 - Cluster NMDS gerado utilizando a abundância de ASVs (Amplicon Sequence Variant) a nível de gênero.



7 DISCUSSÃO

A composição do sedimento de manguezal é um fator-chave que influencia a interação entre a microbiota autóctone e o poluente, e na interação do poluente com próprio sedimento. Essas interações podem afetar a taxa de biodegradação e o sucesso da estratégia de biorremediação. A textura dos sedimentos afeta diretamente a biodegradação de hidrocarbonetos, pois influencia no transporte de água, oxigênio e nutrientes, que acaba sendo comprometido em sedimentos com alto conteúdo argiloso, como os de manguezais. Nesses ambientes, os sedimentos acabam retendo os poluentes, o que pode contribuir para o aumento de sua toxicidade (SANTOS *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2018). Por outro lado, os minerais de argila tendem a reter o contaminante em um determinado local, o que pode favorecer maior tempo de contato dos microrganismos com o poluente, possibilitando sua degradação (MOYO *et al.*, 2014). A salinidade e o pH alcalino são característicos desses ambientes influenciados pela constante inundação com água do mar. As condições encontradas nos sedimentos do manguezal deste estudo assemelham-se a condições de outros manguezais encontrados no estado Ceará, como de Icapuí, Malcozinhado, Curu e Mundaú (BONFIM *et al.*, 2011).

As estirpes de bactérias *Gordonia* sp. HEX 5 e *Micrococcus* sp. HEX 6 que formam o consórcio avaliado nesse estudo, foram isoladas de sedimentos de um manguezal cronicamente contaminado com óleo. São bactérias hidrocarbonoclásticas, ou seja, capazes de crescer utilizando hidrocarbonetos, no caso hexadecano (Figura 7), como única fonte de carbono. Várias espécies de *Gordonia* e *Micrococcus* já foram relatadas como degradadoras de compostos tóxicos, dentre eles hidrocarbonetos (WIESER *et al.*, 2002; ARENSKO *et al.*, 2004; KUMMER *et al.*, 1999). Além disso, esses gêneros também já foram listados entre os 10 mais utilizados no desenvolvimento de produtos para aplicação em biorremediação (VILLELA *et al.*, 2019).

A degradação de alcanos por microrganismos ambientais pode ser realizada por diversas vias, onde diferentes sistemas enzimáticos são responsáveis pela ativação dos alcanos em condições aeróbias ou anaeróbias (JIN *et al.*, 2012). O sistema enzimático alcano hidroxilase (AlkB) tem sido utilizado como um biomarcador para estudos de abundância de diversidade de bactérias degradadoras de alcanos. A pesquisa do gene *alkB* confirmou que HEX 5 carrega esse gene, o que prova o

potencial de pelo menos um dos membros do consórcio para fazer o ataque inicial a esse contaminante. Experimentos anteriores também revelaram a presença desse gene em 17 cepas de *Gordonia* que foram isoladas de diferentes tipos de ambientes (SHEN *et al.*, 2010). A estirpe de *Gordonia* sp. Co17, isolada de sedimento marinho contaminado, revelou a presença do gene *alkB* em seu genoma e apresentou 84,2% de eficiência de degradação de petróleo mesmo em condição de extrema salinidade (KIM *et al.*, 2019). Assim como nesse estudo, a presença do gene *alkB* em diferentes estirpes de *Gordonia* indicam a capacidade desse microrganismo atuar como agente de biorremediação (DELEGAN *et al.*, 2019).

Apesar de *alkB* não ter sido detectado em HEX 6, essa cepa se desenvolve em meio mineral contendo hexadecano como única fonte de carbono, como confirmado neste estudo. Portanto, é razoável supor que deva utilizar outro sistema enzimático de oxidação de alcanos. Em adição, deve-se enfatizar que mesmo as proteínas AlkB compartilhando uma homologia de sequência considerável, as sequências nucleotídicas que codificam o gene *alkB* podem variar bastante nas bactérias (SUN *et al.*, 2014). A diversidade de genes *alkB* já caracterizados representa uma pequena fração da diversidade encontrada em ambientes naturais (CAPPELLETTI *et al.*, 2011; POWELL *et al.*, 2010). Jurelevicius e colaboradores (2013) mostraram que pode ser perdido cerca de 30% ou mais na detecção de bactérias que degradam alcanos, sugerindo utilizar uma combinação de iniciadores para o gene *alkB* (CAPPELLETTI *et al.*, 2011; JURELEVICIUS *et al.*, 2013). Um estudo realizado com bactérias do mar Báltico revelou cerca de 543 genes *alkB* diversos, alguns com baixíssima similaridade com sequências de genes correspondentes em cepas de referência (VIGGOR *et al.*, 2015). Portanto, é necessário utilizar uma combinação de iniciadores para detecção do gene *alkB* em HEX 6, ou até mesmo pesquisar outros genes de degradação de alcanos presentes em seu genoma.

Os diferentes grupos analisados no experimento em microcosmos representam diferentes estratégias de biorremediação. O grupo S, representa o controle negativo; o grupo SH, representa o processo de atenuação natural que ocorre no solo; os grupos SSH, SC e SCH representam diferentes estratégias de bioestimulação; enquanto os grupos SMH e SMSH representam estratégias de bioaumentação + bioestimulação. Alguns estudos mostram que a atenuação natural de contaminantes pode ser tão efetiva quanto estratégias como bioestimulação e bioaumentação (WU *et al.*, 2017).

Porém, alguns estudos também relatam que a bioestimulação associada a bioaugmentação pode ser mais rápida do que apenas a atenuação natural (MACHADO *et al.*, 2019). De modo geral, o que se pode concluir é que a efetividade da estratégia utilizada dependerá também da estrutura da comunidade microbiana autóctone e a sua capacidade de responder ou não à presença do contaminante. Nos microcosmos utilizados neste trabalho, foi possível detectar famílias e gêneros de bactérias reconhecidamente hidrocarbonoclásticas onde houve apenas adição do contaminante hexadecano (SH e SSH), o que corrobora a hipótese de que não necessariamente o solo precisa ser exposto a uma contaminação prévia para que haja estímulo à degradação natural. Contudo, nas condições do solo aqui estudado, a resposta metabólica ao contaminante foi maior e mais rápida nos grupos em que houve bioestimulação (SCH); e bioestimulação + bioaugmentação (SMH e SMSH).

Com relação a análise da comunidade microbiana presente nos microcosmos, no grupo **S** (solo pristino não contaminado), foram identificados majoritariamente os filos Cloroflexi, Actinobacteria, Crenarqueotas e Acidobacteria. Essa composição diferiu daquela encontrada em sedimentos coletados no mesmo manguezal em novembro de 2008 (período seco), na qual os principais filos encontrados foram Firmicutes, Proteobacteria, Cloroflexi e Bacteroidetes (COLARES, 2014). Podem ter contribuído para essas diferenças o fato da coleta de sedimentos no presente estudo ter sido realizada no período chuvoso, além de alterações no local devido a ação natural e antropogênica, como disposição de resíduos sólidos nas margens do Rio Pacoti, crescente ocupação por residências e tráfego de veículos sobre as dunas (SEMA, 2013). Baseado em estudos anteriores, os filos de bactérias predominantes em manguezais são Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Chloroflexi, Acidobacteria, Cyanobacteria, Nitrospirae, Fusobacteria e Planctomycetes (LAW *et al.*, 2019).

A atividade metabólica verificada no grupo **S** não apresentou aumento ao longo tempo, pois não teve nenhum estímulo externo adicionado ao microcosmo durante o experimento. Já o sedimento dos grupos **SH** e **SSH** foram expostos a contaminação pontual por hexadecano. TIRALERDPANICH e colaboradores (2018), demonstraram que microrganismos de solos expostos à contaminação aguda, como nos microcosmos aqui estudados, não apresentam a mesma eficácia de degradação do que microrganismos de áreas que sofrem contaminação crônica por hidrocarbonetos,

por necessitarem de um período maior de adaptação para iniciar a degradação. Isso pode ter contribuído para que as atividades desidrogenásicas em **SH** e **SSH** não tivessem alteração ao longo do tempo, mesmo com a detecção de grande abundância da família Alcanivoracaceae (39% e 25%) nesses grupos. Essa família é conhecida por ser degradadora de hidrocarbonetos em condições aeróbicas (YAKIMOV *et al.*, 2019). Portanto, a exposição da microbiota nativa do manguezal à presença do contaminante promoveu o enriquecimento dessa família com potencial de degradação de alcanos. O principal gênero representante foi *Ketobacter*, já citado na literatura como bactérias hidrocarbonoclasticas obrigatórias. São abundantes em ambiente marinho e podem ser especializadas em degradar alcanos lineares e ramificados (KIM *et al.*, 2018). Isso indica que na comunidade de sedimentos de manguezal existem populações capazes de responder à presença do contaminante, porém com uma intensidade metabólica menor e com maior tempo de adaptação necessário do que quando é realizada a bioaumentação por microrganismos já especializados. A mudança da comunidade através do enriquecimento de microrganismos degradadores já foi observada em outros estudos de biorremediação (WU *et al.*, 2017; RIBICIC *et al.*, 2018a).

Methyloceanibacter também foi abundante nos microcosmos **SH** e **SSH**. Esse gênero contém espécies já isoladas de sedimentos marinhos, são metilotróficos e desempenham um importante papel no ciclo biogeoquímico de compostos contendo 1 carbono, encontrados em grandes concentrações em ambientes marinhos (TAKEUCHI *et al.*, 2014). Algumas estirpes de *Methyloceanibacter* isoladas de sedimentos marinhos já foram citadas como produtores de metano-monooxigenases solúveis, enzimas relacionadas a oxidação de hidrocarbonetos como os alcanos (JIN *et al.*, 2012; PATEL, 1982). Além disso, populações microbianas metanogênicas podem aumentar em abundância relativa em sedimentos onde há ocorrência de degradação de hidrocarbonetos (ATLAS *et al.*, 2015).

Nos microcosmos **SH** e **SSH**, esse grupo pode atuar juntamente com *Ketobacter* na biodegradação do hexadecano. *Methyloceanibacter* também foi abundante no microcosmo **S** onde deve agir na ciclagem natural de compostos contendo 1 carbono. Estudos já demonstraram que a presença de hidrocarbonetos pode influenciar na riqueza e diversidade bacteriana do solo, favorecendo a abundância e distribuição de espécies raras, assim como o que foi detectada neste

trabalho (DONG; WANG; LI, 2020). Além disso, já foi relatado que em ambientes não contaminados, a comunidade microbiana inicial pode contribuir com mais de 15% da comunidade bacteriana degradadora de óleo após uma situação de contaminação (LIU; BACOSA; LIU, 2017). Isso ocorreu nos grupos em que não houve adição do consórcio microbiano, pois houve o enriquecimento de microrganismos capazes de realizar o ataque inicial aos hidrocarbonetos (*Ketobacter*). Esses mesmos microrganismos não foram detectados nos grupos em que houve adição do consórcio (**SMH e SMSH**), o que pode indicar que o próprio consórcio foi capaz de realizar essa oxidação inicial no contaminante. Assim, o enriquecimento aconteceu em outros gêneros de microrganismos possivelmente envolvidos na degradação dos subprodutos do hexadecano.

Os grupos com consórcio imobilizado apresentaram atividade desidrogenásica significativamente maior do que os outros. Isso indica que essa atividade enzimática foi promovida pela presença do consórcio, atuando na degradação do contaminante e influenciando a dinâmica microbiana nos solos dos microcosmos. A diminuição da atividade detectada em **SMH** e **SMSH** ao final de 30 dias para valores de atividade metabólica próximos aos basais, sugere que num intervalo de tempo de pelo menos 18 dias (**T3 a T21**), houve a degradação de boa parte do contaminante pelas bactérias do consórcio juntamente com a microbiota nativa. Outros estudos também mostraram que n-alcenos podem ser degradados principalmente entre os dias 6 e 31, sendo essa degradação intensa principalmente nos primeiros 15 dias para alcenos com 10 a 20 carbonos (RIBICIC *et al.*, 2018a).

Os grupos **SMH** (sedimento, consórcio microbiano e hexadecano) e **SMSH** (sedimento, consórcio microbiano, biossurfactante e hexadecano) apresentaram resposta metabólica mais rápida e mais intensa após o segundo derrame do contaminante. Uma resposta adaptativa semelhante foi relatada por EVANS *et al.*, 2004. Devido à sua propriedade oleofílica, a quitosana pode ter tido efeito facilitador da biodegradação de hexadecano, potencializando a atividade do consórcio de actinobactérias associado à resposta dos microrganismos nativos, conforme citado em outros estudos onde a presença da quitosana auxiliou na degradação de hidrocarbonetos (BAIG; FAIZAN; WAHEED, 2022; ESCUDERO-OÑATE AND MARTÍNEZ-FRANCÉS, 2018).

A primeira análise da comunidade microbiana de sedimentos dos microcosmos aqui analisados, foi realizada apenas 12 dias após o início do experimento, momento

em que houve elevada atividade desidrogenásica. Nesse tempo de análise, não foi possível detectar alta abundância relativa dos microrganismos do consórcio adicionado. A habilidade do consórcio de sobreviver ao longo do tempo depende de vários fatores como sua fixação à matriz do solo, a disponibilidade de substrato, interações com competidores nativos e outros componentes que podem ser associados ao local e às condições ambientais (GOUGH; NIELSEN, 2016). Provavelmente o consórcio atuou no ataque inicial ao hidrocarboneto e sua abundância naturalmente caiu ao longo do tempo, enquanto houve o enriquecimento de outros grupos de microrganismos envolvidos nas etapas subsequentes de degradação. Resultado similar foi verificado por MACHADO *et al.*, 2019, onde o solo contaminado com petróleo foi tratado com adição de um consórcio de microrganismos, porém o consórcio não foi detectado após 45 dias de experimento. Ao invés disso, outros dez gêneros de microrganismos autóctones foram predominantes. Nesse mesmo trabalho, no tratamento por atenuação natural, sete gêneros foram mais abundantes e todos foram diferentes dos detectados no solo tratado por bioaugmentação.

Quanto ao grupo **SCH**, é possível observar que teve atividade desidrogenásica mais alta do que a detectada em **SC**, o que indica que apenas a adição dos componentes quitosana e hexadecano juntos promovem uma resposta metabólica no microcosmo. O aumento da atividade desidrogenásica em **SCH** após o derrame no dia 30, pode indicar que houve uma seleção de microrganismos ao longo dos primeiros 30 dias. A presença da quitosana pode ter influenciado positivamente na assimilação do hexadecano por parte da microbiota autóctone, levando à hipótese de que devido à sua propriedade oleofílica, pode ter tornado o hexadecano mais acessível aos microrganismos na matriz dos sedimentos, causando uma aproximação física das células microbianas com as gotículas de hexadecano e levando ao aumento da atividade metabólica após a reaplicação do contaminante em T30 (GENTILI *et al.*, 2006). GONG *et al.*, 2015, mostraram que a quitosana associada com células bacterianas foi capaz de aumentar a hidrofobicidade da superfície celular, formando uma camada de células compacta na parte externa das gotículas de óleo. No referido trabalho, a quitosana promoveu aumento na taxa de degradação de n-tetradecano por uma estirpe de *Bacillus cereus*.

O uso de células imobilizadas em uma matriz biocompatível como a quitosana, ajuda a manter a viabilidade celular e atividade microbiana por mais tempo por restringir a competição direta com a microbiota autóctone. A quitosana é susceptível a enzimas específicas (quitosanases) e não específicas (carbohidrolases, proteases, lipases, entre outras). As quitosanases de origem bacteriana já foram descritas em diversos gêneros como *Bacillus* sp., *Serratia* sp., *Janthinobacterium* sp. e *Paenibacillus* sp (JOHNSEN *et al.*, 2010; LIANG *et al.*, 2014; TAKASUKA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2011; ZITOUNI *et al.*, 2013). Esses dados podem sugerir um efeito bioestimulador da quitosana para a microbiota autóctone.

DE TENDER *et al.*, 2019 mostraram, por sequenciamento de rRNA 16S, que a presença de quitina aumentou a abundância relativa de microrganismos da rizosfera que estavam envolvidos no ciclo do nitrogênio e da quitina, e sua adição influenciou a composição taxonômica microbiana da rizosfera. Portanto, a quitosana, polímero similar, também pode ter atuado na seleção de microrganismos específicos neste trabalho.

Desulfactérias, presentes principalmente nos grupos **SC** e **SCH**, compreendem bactérias anaeróbicas, redutoras de sulfato, encontradas em água salobra e habitats marinhos. A maioria dos membros dessa família oxidam substratos orgânicos completamente a dióxido de carbono (LIANG *et al.*, 2007). Alguns gêneros também já foram descritos como degradadores de hidrocarbonetos, o que pode também ter contribuído para seu enriquecimento no grupo **SCH** ao longo do experimento (ROSENBERG *et al.*, 2014).

O filo Proteobacteria foi predominante em SC, SCH, SMH e SMSH. Na literatura, esse filo é relatado como dominante em locais contaminados com petróleo (SHAHI *et al.*, 2016). Em **SCH**, há uma prevalência de Firmicutes, assim como encontrado em trabalhos similares onde a abundância relativa desse filo em solos prístinos também aumentou com o aumento das quantidades de nutrientes, bem como teve relação positiva com a remoção de hidrocarbonetos de petróleo (LIU *et al.*, 2020).

Também foi observada alta abundância relativa do gênero *Vibrio* nos grupos **SC**, **SCH**, **SMH** e **SMSH**. Esse gênero já detectado em sedimentos do manguezal utilizado nesse estudo, foi enriquecido nas condições presentes nos microcosmos para atuar na degradação dos componentes adicionados. Já foi demonstrado por

CABRAL *et al.*, 2018 que membros desse gênero podem atuar ativamente na desintoxicação de sedimento de manguezal afetados por derramamento de óleo e por atividades antropogênicas.

Actinobacteria, filo detectado em todos os grupos analisados, compreende microrganismos utilizados para a degradação de hidrocarbonetos, pois são microrganismos amplamente espalhados em ecossistemas poluídos por petróleo, onde desempenham um papel significativo devido a sua diversidade metabólica e sua resistência a condições desfavoráveis (PIDGORSKYI; NOGINA, 2016).

O grupo Flavobactérias, abundantes em SCH e SMH, principalmente após 2º derrame, pode ter sido enriquecido para atuar na degradação do hexadecano. Esse grupo já foi positivamente correlacionado à presença de poluentes em locais contaminados com petróleo, além de possuir genes relacionados à beta-oxidação de hidrocarbonetos (RIBICIC *et al.*, 2018a; MILLER *et al.*, 2019). Em processos de biorremediação, é natural que ocorra a dominância sucessiva de diferentes populações microbianas durante os diferentes estágios da biodegradação.

Em estudos prévios, a adição de biossurfactante em ensaios de biorremediação foi capaz de melhorar a taxa de degradação de hidrocarbonetos alifáticos e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (BOUCHEZ-NAÏTALI; VANDECASTEELE, 2008; BEZZA; CHIRWA, 2017). Seu uso pode contribuir para maior mobilidade dos microrganismos na matriz do solo. O efeito do biossurfactante irá depender das suas propriedades físico-químicas, do tipo de poluente e das características fisiológicas dos microrganismos degradadores (HUA e WANG, 2014). No presente trabalho, a adição de biossurfactante não teve influência na atividade metabólica da comunidade microbiana. Da mesma forma, biossurfactantes produzidos pela cepa *Rhodococcus equi* Ou2 não teve influência na degradação do hexadecano, pois o principal modo de absorção de alcano era provavelmente o contato direto com grandes gotas de óleo (BOUCHEZ-NAÏTALI AND VANDECASTEELE, 2008). Em outro trabalho, uma cepa de *Pseudomonas* pôde aderir à superfície do hexadecano e transportar diretamente o substrato para as células sem secretar surfactante extracelular ou necessitar de emulsificante (GOSWAMI, 1991). O que demonstra a possibilidade de captação desse hidrocarboneto por métodos alternativos, tornando a adição de um componente externo dispensável. Já com relação à comunidade microbiana, houve predominância de *Photobacterium* nesse grupo. Isso foi detectado no início do experimento e coincidiu com alta atividade desidrogenásica. *Photobacterium* é um gênero de

bactérias Gram negativas, já citadas como produtoras de compostos ativos de superfície. Essas bactérias estão amplamente distribuídas em ambiente marinho, onde podem ocorrer nos sedimentos ou associadas a animais marinhos. Algumas espécies possuem a característica de luminescência. (MORALES-GUZMÁN et al., 2021; MUTHUSAMY et al., 2008; URBANCZYK; AST; DUNLAP, 2011). Essa característica e sua resistência a agentes tóxicos possibilita o uso desses microrganismos como biosensores em testes de monitoramento de poluição e toxicidade. Portanto, a presença do contaminante mais biodisponível devido ao biosurfactante, pode ter aumentado a abundância relativa desses microrganismos (CHUN et al., 1997; EFFENDI; KARDENA; HELMY, 2019).

O cluster NMDS gerado utilizando a abundância de ASVs (*Amplicon Sequence Variant*) a nível de gênero mostra a aproximação de grupos que tiveram a adição de componentes externos semelhantes. Em microcosmos microbianos é possível observar diretamente a seleção de microrganismos adaptados a condições específicas em uma escala de tempo de semanas a meses (CRAIG MACLEAN, 2005). Isso ocorre também em ambientes naturais, onde as comunidades microbianas possuem a capacidade de se adaptar e regular seu metabolismo e suas funções de acordo com a presença de diferentes substratos (MORALES-GUZMÁN et al., 2021). Isso pôde ser observado através da dissimilaridade entre as comunidades aqui observadas. Em testes de biorremediação realizado também em microcosmos, análises de NMDS mostraram que a estrutura da comunidade microbiana também sofreram alterações significativas já no estágio inicial de biodegradação, a partir de quatro dias de experimento (HAMDAN; SALAM, 2020).

Por isso, para uma estratégia de biorremediação ser mais completa, é necessário a realização do monitoramento da comunidade microbiana do local para avaliar se está havendo perda de diversidade e se as alterações que ocorrem estão sendo benéficas para a estratégia de biorremediação e para o ecossistema. O ideal é que uma estratégia de biorremediação altere o mínimo possível a dinâmica microbiana natural do local. Muitas vezes, essas alterações são necessárias para diminuir o impacto causado pela contaminação. Neste estudo, apesar de os táxons enriquecidos ao longo do experimento terem tido uma redução em sua abundância relativa ao final dos 60 dias, os seus níveis não voltaram a ficar iguais ao do solo pristino nesse tempo de análise. Para avaliar se o sedimento voltaria ao estado idêntico ao natural, seria

necessário avaliar por um período maior. Porém, os grupos de microrganismos que foram enriquecidos estão direta ou indiretamente envolvidos na degradação do contaminante e, portanto, contribuem de forma positiva para a saúde do sedimento.

8 CONCLUSÕES

A aplicação de um consórcio de actinobactérias autóctones de manguezal, formado pelas estirpes *Gordonia* sp. HEX 5 e *Micrococcus* sp. HEX 6, imobilizado em esferas de quitosana, promoveu a biodegradação de 1% hexadecano em microcosmos de sedimentos de manguezal após 12 dias da contaminação. A bioaugmentação provocou alterações na comunidade bacteriana e a matriz de quitosana tendo um efeito bioestimulador da comunidade nativa, favorecendo o enriquecimento de espécies de bactérias hidrocarbonoclásticas. Os gêneros *Fusibacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio* e *Fontimonas* foram identificados como os mais abundantes durante a biodegradação.

A presente pesquisa resultou em um produto que melhora a resposta da comunidade microbiana à contaminação, promovendo sua reorganização para favorecer a biodegradação do n-hexadecano.

9 CAPÍTULO 2. DESENVOLVIMENTO DE UM BIORREMEDIADOR: DA BANCADA AO MERCADO.

10 INTRODUÇÃO

Com tantos avanços rápidos e inovações disruptivas, a biotecnologia está em constante estado de evolução. A grande questão é: como os empreendedores levam seu conceito ao mercado? Projetar e desenvolver um produto apresenta muitos desafios envolvendo viabilidade técnica, processo de construção, orçamento, conformidade regulatória e capacidade de fabricação.

Antes de se aventurar na empreitada de desenvolver um produto é imprescindível analisar e refletir sobre sua ideia de todos os ângulos para garantir que será um produto viável e próspero. Obter assistência de um parceiro confiável com experiência em biotecnologia pode contribuir para economizar tempo, dinheiro e estresse no desenvolvimento do produto.

Pode-se refinar o conceito do produto realizando pesquisas e análises de mercado para entender a necessidade do produto no mercado. A partir daí, pode-se definir quem será seu usuário, como ele pretende usar seu produto e qual é o resultado esperado. Este exercício definirá a estrutura de um produto de alto nível. Sob esta estrutura, o empreendedor será capaz de criar definições claras do produto que podem ser traduzidas em requisitos do produto e prioridades. Um produto bem-sucedido centrado no cliente será priorizado com base nas necessidades do cliente e no desempenho necessário para o sistema.

O ritmo acelerado das mudanças tecnológicas na indústria de biotecnologia e as demandas do mercado exigem inovação contínua, que, devido à base científica do setor, deriva da pesquisa acadêmica por meio de um processo de transformação que converte o conhecimento orientado pela ciência em produtos comercializáveis. Parece haver algumas dificuldades inerentes em transformar diretamente a produção de conhecimento da pesquisa acadêmica em um produto comercial. Nesse capítulo iremos apresentar o caminho traçado pela Biotech4Life, startup derivada dessa tese de doutorado, para enfrentar as dificuldades e aproveitar as oportunidades do empreendedorismo.

10 RELATO DE EXPERIÊNCIA - O SURGIMENTO DE UMA *STARTUP* DE BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL: BIOTECH4LIFE SOLUÇÕES

O produto validado em escala de laboratório ao longo desta tese é resultado de pesquisas que já resultaram em duas dissertações de mestrado e uma tese de doutorado, além do presente trabalho. A autora desse trabalho é mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais pela Universidade Federal do Ceará e, ao longo do seu mestrado, iniciou o aperfeiçoamento do produto BioClinex. Durante o doutorado, o produto foi validado em escala de laboratório para aplicação em solos de manguezais contaminados por hidrocarbonetos. Esse estudo coincidiu com o evento de contaminação ambiental que atingiu o litoral brasileiro em 2019, causando o maior desastre ambiental da história do Brasil, no qual mais de 3000 km e 980 praias da costa brasileira foram atingidas com um óleo pesado, de origem desconhecida (SOARES et al., 2020). A situação expôs a escassez de medidas de biorremediação e tratamento prontos para aplicação em situações como essa. Isso demonstrou a existência de um mercado ainda inexplorado no Brasil.

Também em 2019, foi lançado o edital nº04/2019 do programa Centelha-CE, abrindo a oportunidade necessária para a captação de investimentos fundamentais para o início da *startup* Biotech4Life Soluções. O Programa Centelha é promovido pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) e pela Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), em parceria com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o Conselho Nacional das Fundações Estaduais de Amparo à Pesquisa (Confap), e operada pela Fundação CERTI. É uma iniciativa que visa estimular a criação de empreendimentos inovadores e disseminar a cultura empreendedora no Brasil.

O produto desenvolvido nessa tese foi submetido ao programa Centelha CE, edital nº 04/2019, como projeto intitulado “BioClineX - Remediador ambiental de contaminação por petróleo”. Após passar por três fases de avaliação, o projeto foi aprovado em primeiro lugar dentre as 856 ideias submetidas ao edital, que resultou em 28 projetos aprovados. O financiamento advindo deste programa estimulou a criação da *startup* Biotech4Life Soluções (Figura 15), em novembro de 2020, pela autora desse trabalho e suas sócias co-fundadoras.

Figura 15 – Logomarca da empresa Biotech4Life Soluções LTDA.



A *startup* tem por missão entregar soluções ambientalmente mais eficientes e sustentáveis, que utilizam microrganismos exclusivos para resolução de problemas ambientais. Atualmente, a Biotech4Life está incubada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (Padetec), localizado dentro do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará.

A equipe de pesquisa e desenvolvimento da *startup* reúne maturidade científica com força de trabalho e dinamismo de jovens pesquisadoras, alinhadas com o estado da arte de mais moderno em biotecnologia ambiental. A empresa tem focado no desenvolvimento de dois principais produtos, sendo um deles o BioClineX, produto aprimorado nessa tese de doutorado. Ambos os produtos são focados em descontaminação ambiental e tratamento de resíduos. Apesar de representarem soluções sustentáveis e inovadoras, os produtos biotecnológicos ainda enfrentam gargalos para sua chegada ao mercado, como o custo de produção e a burocracia envolvida no processo de registro junto aos órgãos regulamentadores. Por isso, algumas *startups* de biotecnologia adotam um portfólio diversificado de modelo de negócios visando aumentar a captação de capital através da prestação de serviços. Isso é determinante para a geração de receita a curto e médio prazos, para subsidiar o longo período intrínseco ao desenvolvimento de negócios de base biotecnológica.

Após a aprovação, em primeiro lugar, do projeto “BioClineX - Remediador ambiental de contaminação por petróleo”, a *startup* foi fundada em novembro de 2020. Ainda em 2020, a Biotech4Life foi incubada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (Padetec), primeira incubadora do Brasil e única do Nordeste a receber do Centro de Referência para Apoio a Novos Empreendimentos (CERNE) a certificação Cerne 3. Atualmente a infraestrutura da Biotech4Life conta com um escritório para atender clientes e parceiros, um laboratório de microbiologia e uma área de bioprocessos para desenvolver nossos produtos.

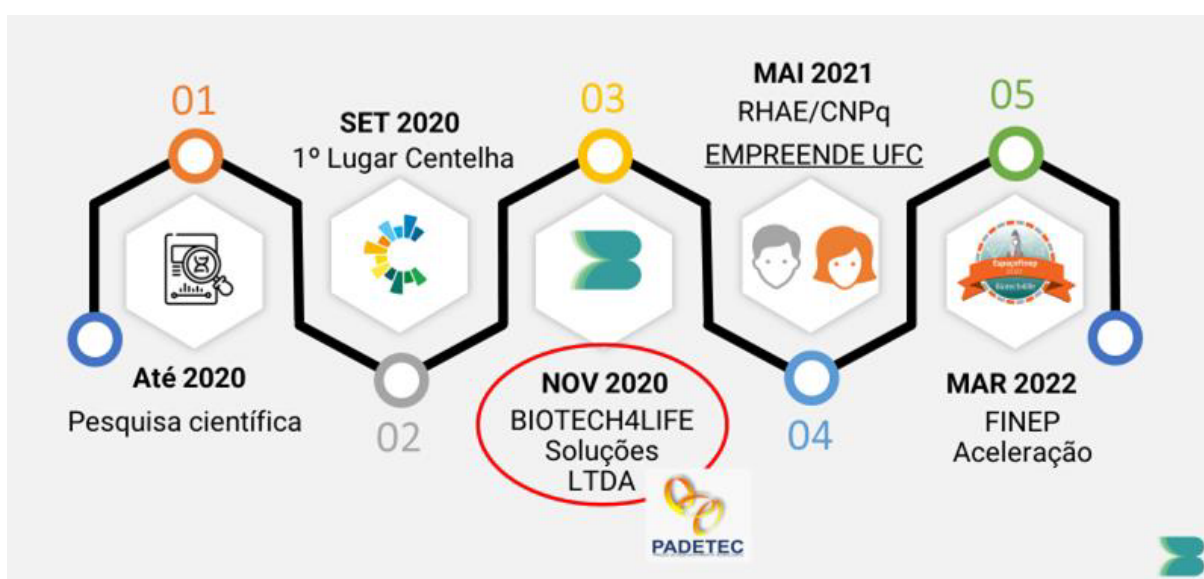
Com foco em economia circular, a Biotech4Life visa contribuir para o desenvolvimento sustentável e está alinhada aos objetivos da “Agenda 2030 para desenvolvimento sustentável” da Organização das Nações Unidas. A economia circular substitui o modelo econômico linear por um modelo circular, cujo objetivo é manter o valor dos produtos pelo maior tempo possível, visando diminuir o desperdício. Na economia circular não existe logística reversa, pois não existe resíduo. Ela se baseia no princípio dos 3Rs – reduzir, reutilizar e reciclar – e também no princípio de maior durabilidade dos produtos, que devem ser projetados com *design* sustentável (GREGORIO; PIÉ; TERCEÑO, 2018).

A Biotech4life também está alinhada aos objetivos traçados para a década de restauração de ecossistemas da ONU (2021 a 2030), que tem como objetivo apoiar governos, organizações multilaterais, sociedade civil, empresas do setor privado, povos indígenas, agricultores, comunidades locais e indivíduos em todo o mundo, para colaborar, desenvolver e catalisar iniciativas de restauração em todo o mundo. O esforço envolverá uma série de atividades que vão desde o redirecionamento de incentivos fiscais e fluxos financeiros para promover a restauração até a realização de pesquisas sobre restauração em ambientes terrestres e marinhos, construção da capacidade técnica de profissionais de restauração em todo o mundo e monitoramento do progresso global na restauração.

Com o andamento do projeto Centelha, a Biotech4Life conseguiu aprovação também no edital Chamada Pública CNPQ/SEMPI/MCTI - RHAE 2020 ganhando três bolsas. Posteriormente foi aprovada também no projeto Empreende UFC, recebendo apoio da Universidade na forma de 3 bolsas para estudantes de graduação, além de treinamentos em empreendedorismo, inovação e negócios. Em 2021, a startup foi selecionada no Programa de Aceleração do Espaço Finep – no qual ficou entre as 10 startups selecionadas no Brasil, sendo a única empresa do Ceará a conseguir aprovação. O processo de aceleração teve duração de aproximadamente cinco meses com foco em modelo de negócios, marketing & vendas e inteligência de mercado. Nesse programa de aceleração, foi realizado um curso de capacitação de 40 h promovido pela empresa ID Singular voltado para marketing e vendas, além de diversos treinamentos voltados para o desenvolvimento dos negócios. O programa foi finalizado em março de 2022 com a apresentação de um *pitch* de vendas na sede do Espaço FINEP, no Rio de Janeiro (Figura 16).

Atualmente, a Biotech4life mantém parcerias com o LEMBIOTECH (Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará); e com a empresa BioSea Industria e Comércio de Produtos Agroecológicos Ltda, pertencente ao Grupo Patense.

Figura 16 – Histórico da startup Biotech4Life Soluções.



Fonte: elaborado pela autora

11 IMPORTÂNCIA DA PROPRIEDADE INTELECTUAL PARA EMPRESAS DE BASE TECNOLÓGICA

Quando os produtos biotecnológicos envolvem invenções, as empresas devem protegê-los através dos direitos conferidos pelas patentes, garantindo o seu uso exclusivo e o monopólio da sua produção. O sistema de patentes protege o inventor contra a competição desvantajosa em relação àqueles que não assumiram o risco financeiro inicial, ao mesmo tempo em que cria condições favoráveis para o emprego do capital de risco na transformação de uma inovação em um produto comercializável. Por isso, o produto desta tese foi protegido na forma de uma patente submetida junto ao INPI sob número de processo: BR 10 2022 015108 3.

O termo "propriedade intelectual" (PI) se refere a tipos de propriedade que resultem da criação humana. Ou seja, é a denominação dada a patentes, marcas registradas, direitos autorais, desenhos industriais e outros tipos de propriedade

intangível que se originam de criações da mente e, em seu sentido mais amplo, não possuem forma física.

Como todos os tipos de propriedade, a PI é uma posse e pode gerar renda. Por essa razão, a PI é considerada um ativo. É geralmente o resultado de um investimento e deverá gerar um retorno. Existem diferentes tipos de PI, cada um com suas próprias leis exclusivas. A PI, algumas vezes, é dividida em duas categorias gerais, “propriedade industrial” e “direito autoral”. A propriedade industrial se refere a ativos criados principalmente para o avanço da tecnologia, indústria e comércio, tais como patentes (invenções), desenhos industriais, marcas registradas, marcas de serviço, segredos comerciais e indicações geográficas de origem (OMPI).

Um dos principais objetivos da propriedade industrial é promover o progresso tecnológico mediante a concessão de monopólio temporal sobre as criações. As patentes protegem as invenções e modelos de utilidade que representam uma novidade e possuem aplicabilidade industrial. Uma patente, geralmente, concede a seu proprietário o direito exclusivo de controlar quem fabrica, usa, vende, oferece para venda e/ou importa qualquer produto ou tecnologia protegida pelas reivindicações da patente.

Segundo o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), as patentes possuem quatro dimensões de proteção:

1. Dimensão temporal: os direitos de propriedade intelectual são concedidos por prazos determinados legalmente;
2. Escopo do direito: delimitação de proteção definida por lei.
3. Segurança jurídica: o direito de propriedade intelectual evita que terceiros possam explorar indevidamente sem a prévia autorização do titular do direito.
4. Territorialidade do direito de propriedade industrial: a propriedade industrial somente tem validade no país de depósito, desde que analisado e concedido, segundo os trâmites legais. Dessa forma, caso se queira exportar e comercializar produtos já patenteados em outros países, é necessária a obtenção de patentes nestes países para garantir ao titular a exploração econômica em cada um desses países.

Para empresas de biotecnologia, os direitos patentários são fundamentais pois possibilitam o retorno dos altos investimentos feitos em PD&I. Em alguns casos, os direitos da patente podem ser os produtos finais da empresa, uma vez que pequenas empresas de biotecnologia licenciam suas inovações patenteadas para empresas maiores que possuem os recursos necessários para produzir a tecnologia.

As patentes também são uma forma de divulgação e permitem que as empresas aprendam o que as concorrentes estão fazendo e se inspirem para avançar em determinada tecnologia, criando suas próprias inovações. Dessa forma, impulsionam a indústria de biotecnologia (KIM; VALENTINE, 2021). Além disso, são de fundamental importância para a obtenção de financiamento, seja por *venture capital* ou por acordos de transferência de tecnologia. Para investidores de risco, não basta saber o número de patentes, mas também o conhecimento exato do que está sob proteção e o quanto pode ser valioso o objeto da patente (GIUGNI; GIUGNI, 2010).

12 FINANCIAMENTO

Transformar uma ideia inovadora em um negócio viável demanda não apenas planejamento e trabalho, mas também uma injeção significativa de capital. A despesa operacional e administrativa de uma nova empresa é alta. Quando se trata de empresas de biotecnologia, o custo inicial de manutenção da empresa pode ser substancial. Isso ocorre devido aos altos custos inerentes aos insumos necessários às atividades, além da necessidade de investimento em pesquisa e desenvolvimento de produto, validação de mercado e construção de uma equipe adequada para superar os desafios de uma nova empresa (DASH, 2019).

O constante investimento em inovação é fundamental para que as *startups* de biotecnologia consigam ter alguma vantagem competitiva em relação a grandes empresas. A obtenção de capital através de recursos não reembolsáveis governamentais é boa estratégia para começar um negócio. Porém, à medida que o negócio cresce, a necessidade de capital aumenta. Para cada etapa de maturidade de uma *startup*, existe um tipo de financiamento adequado (Figura 17).

Ao falar sobre investimentos em *startups* em sua fase inicial, é importante falar sobre o “Vale da Morte”. Essa fase é um dos momentos mais críticos da existência de uma empresa, onde os riscos de chegar à falência são altos. Esses riscos são oriundos de fatores como: endividamento – decorrente da necessidade de investimentos consideráveis para dar início a disponibilização de produtos e serviços que demandam constante aperfeiçoamento, levando-se em conta a existência de concorrentes potenciais, entre outros.

Figura 17 – Tipos de financiamento adequados a cada fase de desenvolvimento de uma startup.



A necessidade de apoio financeiro não termina quando a *startups* começa a prosperar. Em cada nova fase é preciso contar com um aporte maior para expandir. O problema é que nem sempre o empreendedor sabe como conseguir investimento para sua startup. Quando o negócio está começando, o alto risco limita a capacidade de conseguir investimentos de alto valor. Já quando a startup está em franca expansão e conta com mais credibilidade no mercado, é possível obter um aporte maior (GARG; GUPTA, 2021).

Existem diversas iniciativas de fomento à novos negócios inovadores, tanto no setor público quanto privado. Até o presente, a Biotech4Life recebeu apenas subvenções públicas (CENTELHA, CNPq/RHAE, EMPREENDE/UFC; FINEP), o que possibilitou sua abertura e seu crescimento.

13.1 Financiamento público

O financiamento obtido a partir de órgãos públicos pode ser de dois tipos: financiamento a juros reduzidos e programas de incentivo a fundo perdido. Além desses, há também o programa de incentivo às empresas inovadoras através da Lei do Bem.

Alguns exemplos de financiamento a juros reduzidos direcionados a projetos inovadores são as linhas INOVACRED da FINEP e BNDES-MPME. Esse tipo de financiamento é reembolsável, isto é, deve ser pago de volta ao órgão financiador em um prazo previamente definido.

Normalmente esse tipo de financiamento oferece melhores condições pois possui taxa de juros acessíveis, maior prazo de carência e de amortização. Isso significa a possibilidade de trabalhar com parcelas menores adequadas ao orçamento da empresa. Outra vantagem adicional de se obter um empréstimo como este é obter um selo de parceiro de uma instituição pública, o que agrega credibilidade à empresa junto ao mercado. Porém, a desvantagem desse processo é que ele é mais trabalhoso pois exige um plano de negócios muito bem estruturado. Muitas vezes, o processo de obtenção desse tipo de recurso é burocrático e requer tempo.

Antes de dedicar tempo para obtenção desse tipo de recurso, é importante escolher a linha de financiamento adequada para a empresa, levando em consideração o faturamento e se é permitido direcionar o recurso para o que é pretendido pela empresa.

Os programas de incentivo a fundo perdido ou subvenção são aqueles em que órgãos públicos de fomento disponibilizam recursos não reembolsáveis a empresas ou projetos inovadores, isto é, o capital recebido não precisa ser pago de volta ao órgão de fomento.

Para que uma empresa consiga captar um fundo perdido para desenvolvimento tecnológico, ela precisa ser realmente inovadora do ponto de vista técnico, isto é, a empresa precisa estar à frente no estado da arte da tecnologia em sua área de atuação. Em alguns casos, ao final do período de investimento é preciso prestar contas junto ao órgão de fomento sobre no que foi investido o dinheiro obtido e esse processo pode ser demorado e burocrático. Ainda assim, a captação de recursos a fundo perdido é um grande facilitador no desenvolvimento de *startups* em fase inicial, de alto risco e que possuem poucos recursos. Um exemplo de financiamento deste tipo é o “Programa Centelha”, que estimulou a fundação da *startup* Biotech4Life Soluções.

Outro exemplo de incentivo a empresas que buscam inovar é a Lei do Bem (Lei 11.196/05). Ela oferece incentivos fiscais a empresas que realizam pesquisa e desenvolvimento de inovação tecnológica. O governo federal, por meio do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI), utiliza esse mecanismo para incentivar investimentos em inovação por parte do setor privado. Além disso, busca aproximar as empresas das universidades e institutos de pesquisa, potencializando os resultados em P&D. Existem alguns pré-requisitos para obter os incentivos fiscais da Lei do Bem, são eles: regime de lucro real, lucro fiscal, regularidade fiscal e

investimento comprovado em pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I). Para que a empresa seja elegível e possa usufruir dos incentivos fiscais da Lei do Bem, deve-se provar que houve etapas de estudo e experimentação para a resolução de desafios técnicos no desenvolvimento do produto ou processo.

Diferentes programas que contribuem direta ou indiretamente para o desenvolvimento de *startups* inovadoras já foram criados. Isso torna o ambiente de empreendedorismo inovador do Brasil mais diversificado. Assim como em outros países, os formuladores de políticas para inovação em startups precisam considerar não apenas a questão de investimento e capitalização de empresas como também um conjunto de atores e mecanismos de governança que compõem essas redes de organizações e instituições, como empreendedores, investidores, pesquisadores em instituições de ciência e tecnologia, grandes empresas, além de associações, incubadoras, aceleradoras e mentores.

Segundo o estudo “Inovação e Empreendedorismo: Políticas Públicas e Ações Privadas”, existiam até 2017, 25 iniciativas de fomento no Brasil (Tabela 4). A maior parte delas criadas após os anos 2000. Desde então, houve aumento no número de iniciativas implementadas, indicando o crescimento do estímulo a empresas inovadoras no país.

Tabela 4 - Programas de apoio a pequenas empresas no Brasil.

Nome do programa	Instituição
Conexão Startup-Indústria	ABDI
Criatec I	BNDES
Criatec II	BNDES
Criatec III	BNDES
BNDES MPME Inovadora	BNDES
Inova Talentos	CNI/CNPq
Procompi	CNI/Sebrae
RHAE	CNPq
Pipe I e II	Fapesp
Inovar	Finep
Pappe Subvenção/ Integração	Finep
Tecnova	Finep
Inovacred	Finep
Pipe/Pappe(PIPE III)	Finep/Fapesp
Finep Startup	Finep
Seed-MG	Governo estado MG
Sinapse da Inovação	Governo estado SC
Pitch-GovSP	Governo estado SP
Startup Brasil	MCTI
PNI (Incubadoras)	MCTI/CNPq
Inovativa	MDIC
Techsampa (Vaitec)	Prefeitura SP
ALI (Agentes Locais de Inovação)	Sebrae
Sebraelab	Sebrae
Sesi-Senai de Inovação	Sesi/Senai

Fonte: (FREIRE; MARUYAMA; POLLI, 2017)

13.2 Financiamento privado

O financiamento via setor privado é outra opção de obtenção de capital, que pode ser, inclusive, mais rápida do que o financiamento público. Um exemplo de investimento privado possível para as fases iniciais de uma *startup* é a captação de “investidores-anjo”. São investidores especializados em empresas inovadoras e com potencial de crescimento. Se tiverem boas referências do empreendedor e do projeto,

podem injetar capital na empresa em troca de uma participação nas quotas. Existem também os grupos de investidores-anjo, que atuam com mais de um investidor, em conjunto, para avaliar projetos. Esses tipos de investidores costumam atuar como mentores da empresa investida, participando ativamente do desempenho do negócio e agregando sua *expertise* a equipe. Isso pode ser bastante benéfico para uma empresa em estágio inicial de desenvolvimento (MATOS; RADAELLI, 2020).

O Marco Legal das Startups, em seu art. 17, alterou a Lei Complementar nº 123, de 14 de dezembro de 2006, passando a vigorar a seguinte definição legal de investidor-anjo:

§ 2º O aporte de capital poderá ser realizado por pessoa física, por pessoa jurídica ou por fundos de investimento, conforme regulamento da Comissão de Valores Mobiliários, que serão denominados investidores-anjos.

Assim, de acordo com a definição legal, o investidor-anjo pode ser pessoa física, pessoa jurídica ou fundo de investimentos que realiza aporte de capital em sociedades enquadradas como microempresa ou empresa de pequeno porte, sendo que este capital não integrará o capital social da empresa. Geralmente os investimentos realizados por investidores-anjo variam R\$ 250.000,00 (duzentos e cinquenta mil reais) e R\$ 500.000,00 (quinhentos mil reais).

Quando o negócio tem um grande apelo e impacto para a sociedade, isto é, desperta o interesse coletivo, ele pode tentar obter capital através de *crowdfunding*, uma modalidade de financiamento coletivo realizada através da agregação de múltiplas fontes de financiamento, em geral pessoas físicas interessadas na iniciativa.

Para sua conceituação, vale transcrever a definição prevista na Instrução CVM 88:

Art. 2º Para fins desta Resolução, aplicam-se as seguintes definições:

I – crowdfunding de investimento: captação de recursos por meio de oferta pública de distribuição de valores mobiliários dispensada de registro, realizada por emissores considerados sociedades empresárias de pequeno porte nos termos desta Resolução, e distribuída exclusivamente por meio de plataforma eletrônica de investimento participativo, sendo os destinatários da oferta uma pluralidade de investidores que fornecem financiamento nos limites previstos nesta Resolução;

Outro tipo é o equity crowdfunding, onde a startup de pequeno porte irá realizar uma oferta pública, através de uma plataforma online de investimento participativo, e

os investidores interessados poderão adquirir participação societária nesta startup (DEL SANT, 2022).

Existem também os fundos de investimentos privados, que definem suas próprias regras. Regulados pela Instrução CVM n. 578, de 30 de agosto de 2016 (ICVM 578), os Fundos de Investimento são subdivididos em: fundos de *seed capital* (fundos de capital semente), fundos de *venture capital* (fundos de capital de risco) e fundos de *private equity*. Basicamente, a fase em que o investimento é recebido é o que determina a modalidade de investimento adotada (Figura 17).

Outro exemplo de captação de recursos é através da interação mutualística entre grandes empresas e *startups*. Essa interação surgiu com o objetivo de desenvolver inovação. As grandes empresas buscam nessa colaboração o acesso a novos mercados, redes de conhecimento e recursos humanos especializados; solução de problemas específicos, como teste de produtos e de escala das operações; e estímulo à cultura de inovação interna da empresa. Esse processo conhecido como “Inovação aberta” é um modelo de gestão que promove um desenvolvimento disruptivo na empresa, por meio da descentralização da sua mentalidade inovadora. Já a *startup* consegue recursos para operacionalizar a produção de um determinado produto ou desenvolver um processo inovador com o apoio da grande empresa (MARCOLIN; VEZZETTI; MONTAGNA, 2017).

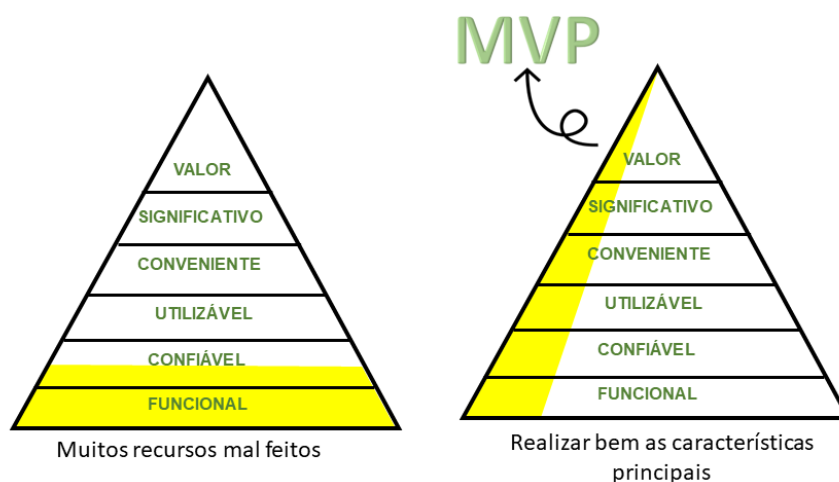
14 ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO MÍNIMO VIÁVEL

A definição de produto mínimo viável (MVP) foi primeiramente introduzida pela metodologia *Lean Startup*, definida por Frank Robinson em 2001 e divulgada por Eric Ries em 2009. MVP significa “uma versão de um novo produto, que permite que uma equipe colete o máximo de aprendizado validado sobre os clientes com o mínimo de esforço”. O MVP contribui para que o processo de aprendizagem a respeito do produto seja iniciado. A diferença do MVP para um protótipo ou prova de conceito é que o MVP é projetado não somente para responder a questões técnicas, mas para testar hipóteses fundamentais inerentes aos negócios (RIES, 2009).

O MVP é o ponto fundamental do ciclo construir-medir-aprender da metodologia *Lean startup*, onde o empreendedor deve transformar ideias em produtos, medir como os clientes respondem e decidir se devem desistir ou perseverar. Essa primeira versão do produto deve ser direcionada aos adotantes iniciais ou clientes visionários antes

de ser levado ao mercado de massa (Figura 18). Esses clientes aceitam uma solução que resolva pelo menos 80% do problema, eles não precisam de uma solução perfeita para sentirem interesse e por isso, são os clientes iniciais ideais para validar a primeira versão do produto. Muitos empreendedores superestimam o número de funcionalidades necessárias a um MVP. Ele pode ser simples o suficiente para dar início a aprendizagem sobre mercado (LENARDUZZI; TAIBI, 2016).

Figura 18 – Principais características de um bom MVP.



Fonte: Elaborado pela autora.

Antes que um produto chegue a MVP, ele passa por diferentes níveis de maturidade tecnológica (TRL - *Technology Readiness Level*). Essa métrica possibilita avaliar a maturidade de uma determinada tecnologia, bem como compará-la a outras tecnologias existentes. Atualmente, é uma métrica utilizada também para avaliação de projetos e de produtos em editais de fomento como por exemplo o programa de aceleração da FINEP do Espaço FINEP, o qual a Biotech4Life participou. O nível de maturidade varia de 1 a 9 (Tabela 5, Figura 19).

Tabela 5 - Níveis de Maturidade Tecnológica ou TRL (*Technology Readiness Level*) e seus aspectos característicos.

TRL	CARACTERÍSTICAS
1	Ideia da pesquisa que está sendo iniciada e esses primeiros indícios de viabilidade estão sendo traduzidos em pesquisa e desenvolvimento futuros.
2	Os princípios básicos foram definidos e há resultados com aplicações práticas que apontam para a confirmação da ideia inicial.
3	Em geral, estudos analíticos e/ou laboratoriais são necessários nesse nível para ver se uma tecnologia é viável e pronta para prosseguir para o processo de desenvolvimento. Nesse caso, muitas vezes, é construído um modelo de prova de conceito.
4	Coloca-se em prática a prova de conceito, que consiste em sua aplicação em ambiente similar ao real, podendo constituir testes em escala de laboratório.
5	A tecnologia deve passar por testes mais rigorosos do que a tecnologia que está apenas na TRL 4, ou seja, validação em ambiente relevante de componentes ou arranjos experimentais, com configurações físicas finais. Capacidade de produzir protótipo do componente do produto.
6 MVP	A tecnologia constitui um protótipo totalmente funcional ou modelo representacional, sendo demonstrado em ambiente operacional (ambiente relevante no caso das principais tecnologias facilitadoras).
7	O protótipo está demonstrado e validado em ambiente operacional (ambiente relevante no caso das principais tecnologias facilitadoras).
8	A tecnologia foi testada e qualificada para ambiente real, estando pronta para ser implementada em um sistema ou tecnologia já existente.
9	A tecnologia está comprovada em ambiente operacional (fabricação competitiva no caso das principais tecnologias facilitadoras), uma vez que já foi testada, validada e comprovada em todas as condições, com seu uso em todo seu alcance e quantidade. Produção estabelecida.

Fonte: (MANKINS, 2004)

Figura 19 – Escala de desenvolvimento TRL, da universidade ao setor produtivo.



Fonte: elaborado pela autora.

14.1 BioClinex – Remediador de contaminação ambiental por petróleo.

O remediador ambiental BioClineX foi desenvolvido para aplicação em locais contaminados com resíduos e derivados de petróleo. Esse produto é constituído de uma matriz polissacarídica que após biodegradação fornece nutrientes para o meio, funcionando como bioestimulador natural, e um inóculo elevado de bactérias especializadas para degradar os resíduos.

O desenvolvimento do BioClineX foi realizado ao longo do presente projeto. Inicialmente, o produto estava em fase de maturidade tecnológica TRL 3. Após a realização de validação em escala de laboratório simulando a situação real em microcosmos; avaliação de testes mais rigorosos por maior período e com diferentes controles; aumento da produção e teste em ambiente relevante, foi possível formular um protótipo e posteriormente, um MVP que reúne as principais características funcionais propostas para esse produto. Dessa forma, avançou até a fase de maturidade tecnológica TRL 7. Isso possibilitou a redação da patente deste produto para garantir a proteção de sua utilização apenas pelos autores. O produto desenvolvido deve chegar ao mercado após seu registro e regulamentação junto ao IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis), como biorremediador ambiental (Figura 20).

Figura 20 – *Design* da parte frontal da embalagem do BioClineX.



14.2 - Formulação de produtos

Um grande desafio para o desenvolvimento de produtos biológicos para aplicação ambiental é a determinação da sua composição. Isto é, a formulação do produto precisa reunir características desejáveis como manutenção da viabilidade celular, longo tempo de prateleira e manutenção das suas funções. Para manter a funcionalidade dos produtos durante a aplicação, em sua formulação são incluídas substâncias conhecidas como adjuvantes.

A compatibilidade entre os adjuvantes e os ativos biológicos é avaliada para garantir a viabilidade, crescimento e reprodução dos microrganismos. A formulação deve também garantir que as características de desempenho como eficácia, adequação aos requisitos de aplicação, solubilidade em água e compatibilidade com outros compostos do local de aplicação estejam apropriados. Além disso, precisa ter custo compatível com o processo de escalonamento da produção.

É possível desenvolver formulações com diferentes formatos:

- Pó concentrado;
- Gel;
- *Beads*;
- Barras;
- Líquido - Suspensão concentrada;
- Grânulos solúveis.

Todos esses formatos são regulamentados pela ABNT e todos os produtos devem conter no rótulo, obrigatoriamente, a concentração do componente biológico ativo.

Os produtos desenvolvidos pela Biotech4Life foram formulados seguindo essas premissas. Para a produção dos microrganismos foi desenvolvido um meio de cultivo de menor custo que os meios de cultivo comerciais, com composição que não cause impacto negativo ao local de aplicação. Para redução de custo, os ingredientes normalmente utilizados foram substituídos por componentes agroindustriais de baixo custo. O meio de cultivo desenvolvido para o escalonamento da produção de microrganismos, chamado meio B4L, promoveu uma redução de 95% do custo desse processo (Tabela 6). Sua formulação completa é mantida sob sigilo na empresa Biotech4Life.

Tabela 6 – Comparativo entre custos para preparo de 1L do meio MRS comercial e do meio B4L.

Meio de cultivo	Preço/L
MRS comercial padrão	R\$ 90,00
Meio B4L	R\$ 4,50

Fonte: elaborado pela autora.

Apesar de os microrganismos serem o componente ativo presente nos produtos, os adjuvantes complementam a formulação e garantem a sua qualidade. Para desenvolver a formulação completa, a equipe da Biotech4Life participou de uma mentorias, facilitadas pela FINEP, durante o programa de aceleração do Espaço FINEP, o qual a Biotech4Life participou em 2022. Além disso, a equipe participou de outras mentorias do mesmo programa de aceleração e realizou uma vasta pesquisa na literatura para determinar quais os componentes adequados ao produto e à sua finalidade.

A utilização da formulação no formato em pó foi o mais desejável, uma vez que garante maior tempo de prateleira dos produtos biológicos, facilidade de transporte e de armazenamento.

A mudança do formato inicial dos produtos de suspensão concentrada para pó foi realizada, inicialmente, utilizando o equipamento *Spray Dryer* (Figura 21), equipamento disponibilizado pelo Padetec, onde a empresa está incubada. Diferentes

configurações de funcionamento foram testadas até atingir a obtenção de um pó contendo os microrganismos viáveis e as características desejáveis. Porém, essa metodologia mostrou-se inviável, por ser um processo lento e pouco eficiente para essa finalidade. Concluiu-se que outra metodologia seria necessária para alcançar a formulação em pó com custo compatível com o mercado. Assim, testes foram realizados para o desenvolvimento de uma metodologia de produção que dispensasse a utilização do *spray dryer* (Figura 21).

Figura 21 – *Spray Dryer* utilizado nos experimentos realizados. Modelo DL-41 – Marca: Yamato-Ohkawara.



Fonte: foto captada pela autora.

Foi então realizada a seleção de compostos candidatos para compor a formulação com objetivo de secagem da amostra para obtenção do pó (Figura 22). Também foram escolhidos componentes que pudessem conservar o produto e suas características por mais tempo. Foram realizados testes para avaliar a viabilidade dos microrganismos junto aos componentes e o tempo de prateleira das diferentes versões dos produtos formulados. Também foram avaliadas diferentes temperaturas

de armazenamento dos produtos (4 °C e 30 °C). O tempo de prateleira será acompanhado até pelo menos 24 meses.

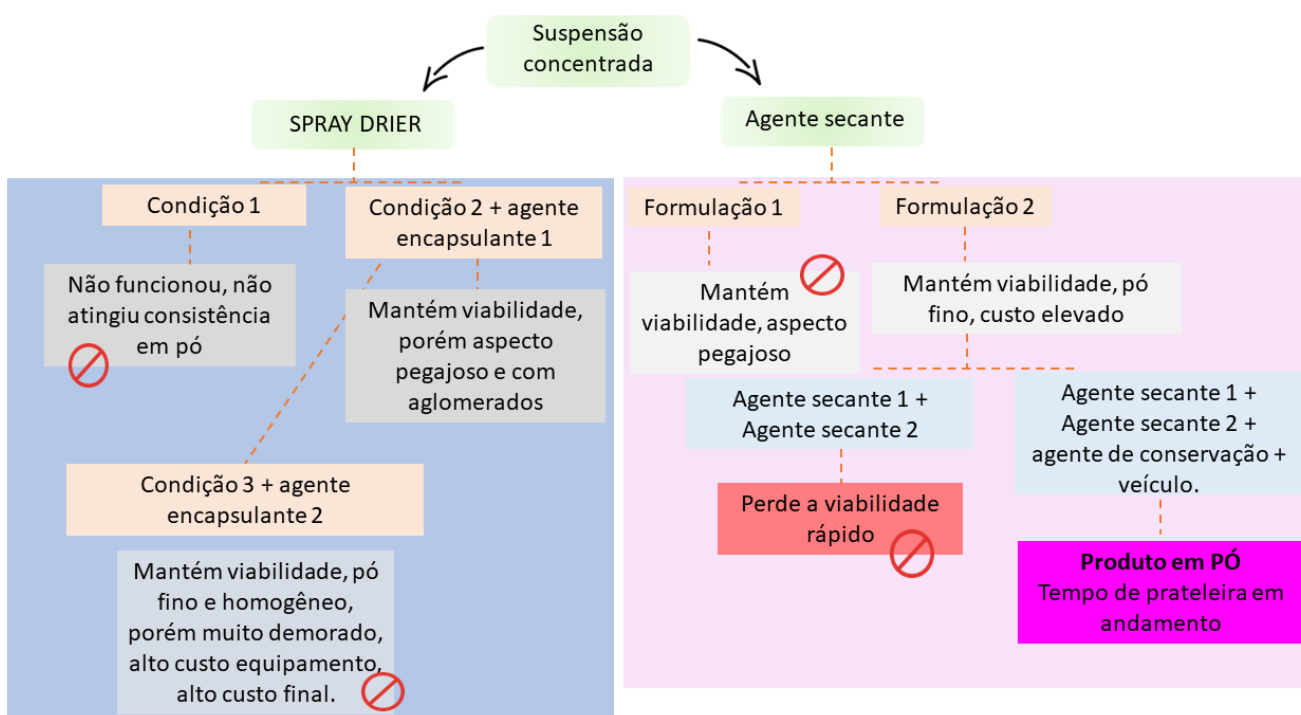
Figura 22 – Diferentes versões dos produtos em pó testadas, desenvolvidas pela Biotech4life.



Fonte: foto captada pela autora.

A formulação atingida dispensa a utilização de equipamentos como centrífuga ou *spray dryer*, reduzindo o custo final do processo (Figura 23). Ela inclui dois agentes secantes, um agente de conservação e um composto veículo, além dos microrganismos ativos. Os produtos mantiveram a viabilidade microbiana mesmo após 3 meses de armazenamento à temperatura ambiente (28 °C).

Figura 23 – Resumo das etapas seguidas para a criação da formulação em pó a partir da suspensão concentrada.

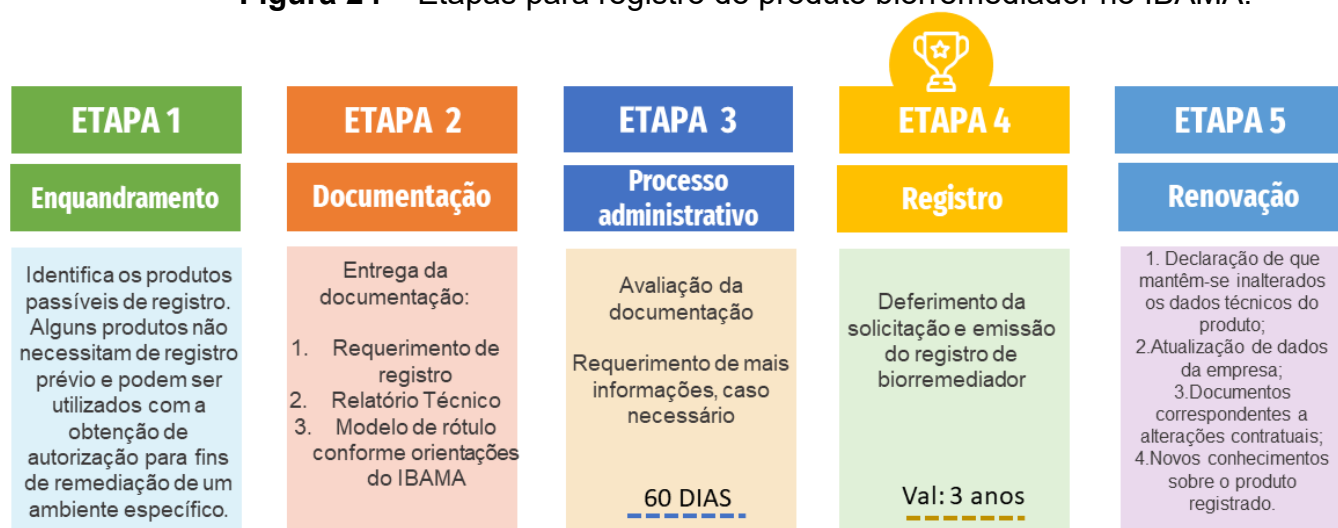


15 REGISTRO DE PRODUTOS BIORREMEDIADORES

Conforme as características do produto desenvolvido, ele se enquadra na categoria de biorremediador ambiental. A Resolução Conama nº 463, de 29 de julho de 2014, que revogou a Resolução Conama nº 314, de 29 de outubro de 2002, determina que os remediadores devem ser registrados junto ao IBAMA para fins de comercialização e utilização, bem como necessitam de autorização prévia para a pesquisa e experimentação.

De acordo com a definição dada por essa Resolução, remediador é o produto ou agente de processo físico, químico ou biológico destinado à recuperação de ambientes e ecossistemas contaminados e ao tratamento de efluentes e resíduos. Essa resolução determina que qualquer tipo de remediador depende da prévia autorização do órgão ambiental competente, municipal, estadual ou federal para sua comercialização. A Instrução Normativa Ibama (IN) nº 5, de 17 de maio de 2010, que estabelece os procedimentos e exigências a serem adotados para o efeito de registro, renovação de registro e autorização prévia para a realização de pesquisa e experimentação com produtos remediadores (Figura 24).

Figura 24 – Etapas para registro de produto biorremediador no IBAMA.



Fonte: elaborado pela autora.

Essas etapas a serem seguidas no processo de registro garantem a análise de documentos e estudos a respeito do biorremediador, incluindo composição, indicação de uso e modo de aplicação. Isso contribui para evitar a aplicação produtos perigosos e a adoção de soluções incompatíveis com o ambiente a ser descontaminado.

Apesar de aparentemente simples, o processo de registro de produtos biorremediadores ainda é um gargalo para a comercialização de novos produtos para remediação ambiental. Isso ocorre porque os testes e ensaios exigidos pela Instrução Normativa N°5 de 17 de maio de 2010, para fundamentar o pleito de registro deverão ser conduzidos em laboratório certificado segundo a ISO 17025, com base em metodologias cientificamente reconhecidas. Além disso, desde 2015, só são aceitas análises realizadas em laboratórios monitorados pelo Instituto Nacional de Metrologia e Normalização-INMETRO, de acordo com os Princípios das Boas Práticas de Laboratórios – BPL, o que eleva em muito o custo para a obtenção das análises necessárias. Todo o processo de avaliação do pleito de registro (Etapa 3 – Figura 24) pelo IBAMA tem um prazo de até 60 dias para sua conclusão, porém esse prazo tem sua contagem suspensa quando o IBAMA solicita ao requerente, por escrito e fundamentadamente, documentos ou informações adicionais aos definidos pela Instrução Normativa, recomeçando a contagem a partir do atendimento à solicitação, pelo tempo que faltar, acrescidos de mais 30 (trinta) dias.

Outro fator que precisa ser levado em consideração é que para registro junto ao IBAMA de um remediador que apresente indicação de uso em ambientes domiciliares, públicos ou coletivos, o produto deverá ter sido previamente registrado junto ao órgão federal competente do setor de saúde (ANVISA), como saneante, o que acarreta em um maior período necessário para a conclusão de todo o processo de registro.

Tudo isso faz com que o registro se torne demorado, burocrático e de alto custo. Para *startups*, o tempo é valioso, tudo precisa acontecer de forma rápida para evitar que a empresa caia no chamado “Vale da Morte” antes de conseguir comercializar o seu produto. Por isso, o registro se torna um fator limitante para muitas *startups* dessa área, levando-as a alterar o seu produto para gerar fluxo de caixa. Isso também favorece as grandes empresas já bem estabelecidas no mercado, quanto a concorrência.

O produto BioClineX está na etapa 2 para obtenção de registro, onde a documentação necessária para solicitação está sendo estruturada.

16 CONCLUSÕES

Os resultados desta tese resultaram no desenvolvimento de um biorremediador ambiental (BioClineX), desenvolvido para aplicação em ambientes contaminados com resíduos de petróleo e derivados, e na abertura da *startup* Biotech4life Soluções. O produto encontra-se em nível de maturidade tecnológica TRL7, com produção escalonável. O processo de desenvolvimento do produto encontra-se protegido pelo depósito de patente BR 10 2022 015108 3.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. O. *et al.* Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 3, n. 1, p. 28–39, 2015.
- AFONSO, Filipa *et al.* Community perceptions about mangrove ecosystem services and threats. **Regional Studies in Marine Science**, v. 49, p. 102114, 2022.
- ALEF, K. Dehydrogenase activity. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**, p. 228-231, 1995.
- AL-HAWASH, Adnan B. *et al.* Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 2, p. 71-76, 2018.
- ALLARD, Sarah M. *et al.* Introducing the mangrove microbiome initiative: identifying microbial research priorities and approaches to better understand, protect, and rehabilitate mangrove ecosystems. **MSystems**, v. 5, n. 5, p. e00658-20, 2020.
- ALONGI, Daniel M. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbial ecology**, v. 15, p. 59-79, 1988.
- ALONGI, Daniel M. Carbon cycling and storage in mangrove forests. **Annual review of marine science**, v. 6, p. 195-219, 2014.
- AMANI, Hossein *et al.* Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 75, n. 1-2, p. 209-214, 2010.
- ANDREOTE, Fernando Dini *et al.* The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38600, 2012.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- ANGELIM, A. L. *et al.* An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **Journal of environmental management**, v. 127, n. October, p. 10–7, 2013.
- ARENSKO, M.; BRO, D.; STEINBU, A. Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia*. **Applied and environmental microbiology**. v. 70, n. 6, p. 3195–3204, 2004.
- ATLAS, Ronald M. *et al.* Oil biodegradation and oil-degrading microbial populations in marsh sediments impacted by oil from the Deepwater Horizon well blowout. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 14, p. 8356-8366, 2015.
- 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. 1–18, 2016.

BACOSA, Hernando Pactao et al. From Surface Water to the Deep Sea: A Review on Factors Affecting the Biodegradation of Spilled Oil in Marine Environment. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 10, n. 3, p. 426, 2022.

BACOSA, Hernando P.; INOUE, Chihiro. Heavy oil degrading Burkholderia and Pseudomonas strains: insights on the degradation potential of isolates and microbial consortia. 2020.

BAIG, Umair; FAIZAN, M.; WAHEED, Abdul. A review on super-wettable porous membranes and materials based on bio-polymeric chitosan for oil-water separation. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 102635, 2022.

BANAT, IBRAHIM M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource technology**, v. 51, n. 1, p. 1-12, 1995.

BARBIER, E. B. The protective service of mangrove ecosystems: A review of valuation methods. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, n. 2, p. 676–681, 2016.

BELLOCCO, A. M. *et al.* Microemulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 20, n. 3-4, p. 167-272, 1984.

BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil. **Chemical Engineering Journal**, v. 309, p. 563–576, 2017.

BOUCHEZ-NAÏTALI, M.; VANDECASTEELE, J. P. Biosurfactants, an help in the biodegradation of hexadecane? the case of Rhodococcus and Pseudomonas strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 9, p. 1901–1907, 2008.

CABRAL, L. *et al.* Microbial functional responses to long-term anthropogenic impact in mangrove soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 160, n. January, p. 231–239, 2018.

CALLAHAN, B. J., MCMURDIE, P. J., ROSEN, M. J., HAN, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.*, 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

CALLAHAN, B. J., MCMURDIE, P. J., & HOLMES, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11, 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

CALLAHAN, B. (2018). Silva taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 132) Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1172783>

CAPORASO, J. Gregory et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 108, n. supplement_1, p. 4516-4522, 2011.

CAPPELLETTI, M. *et al.* Analyses of both the *alkB* Gene transcriptional start site and *alkB* promoter-inducing properties of *Rhodococcus* sp. Strain BCP1 grown on n-Alkanes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1619–1627, 2011.

CASTAÑO-ISAZA, J.; LEE, S; DANI, S. FORCES OF NATURE. In: Beck, M.W.; Narayan, S.; Losada, I.J.; Hermosa, A.E.; Ortega, S.T. **Assessment and Economic Valuation of Coastal Protection Services Provided by Mangroves in Jamaica**. Disponível em: <https://www.profor.info/content/forces-nature>. Acesso em: 17 jan. 2021.

CHICCA, Ilaria *et al.* Innovative Culturomic Approaches and Predictive Functional Metagenomic Analysis: The Isolation of Hydrocarbonoclastic Bacteria with Plant Growth Promoting Capacity. **Water**, v. 14, n. 2, p. 142, 2022.

CHIKERE, Chioma Blaise; OKPOKWASILI, Gideon Chijioke; CHIKERE, Blaise Ositadinma. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. **3 Biotech**, v. 1, p. 117-138, 2011.

CHUN, Uck-Han *et al.* Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum*. **Resources, conservation and recycling**, v. 18, n. 1-4, p. 25-40, 1996.

COLARES, G. B.; MELO, V. M. M. Relating microbial community structure and environmental variables in mangrove sediments inside *Rhizophora mangle* L. habitats. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 171–177, 2013.

COLARES, G. B. **Ecologia microbiana em sedimentos de manguezais do estado do Ceará**. Tese (Pós - Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

COTTA, S. R. *et al.* Exploring bacterial functionality in mangrove sediments and its capability to overcome anthropogenic activity. **Marine Pollution Bulletin**, v. 141, n. September 2018, p. 586–594, 2019a.

COTTA, S. R. *et al.* Exploring bacterial functionality in mangrove sediments and its capability to overcome anthropogenic activity. **Marine Pollution Bulletin**, v. 141, n. March, p. 586–594, 2019b.

CRAIG MACLEAN, R. Adaptive radiation in microbial microcosms. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 18, n. 6, p. 1376–1386, out. 2005.

DA CONCEIÇÃO AQUINO DE SÁ, M. *et al.* Distribution of *PLD* and *FagA*, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 265–268, 2013.

DASH, S. Startups companies: Life cycle and challenges. **International Journal of Psychosocial Rehabilitation**, v. 26, n. 6, p. 732-737, 2019.

DE TENDER, C. *et al.* Peat substrate amended with chitin modulates the N-cycle, siderophore and chitinase responses in the lettuce rhizobiome. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

DELEGAN, Y. A. *et al.* Characterization and genomic analysis of highly efficient thermotolerant oil-degrading bacterium *Gordonia* sp. 1D. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 1, p. 41–48, 2019.

DEL SANT, J. Quatro principais tipos de investimentos externos para startups. Direito Empresarial, Estrutura Societária, Startups – ND&M Advogados. Disponível em: <https://ndmadvogados.com.br/artigos/04-principais-tipos-de-investimentos-externos-para-sua-startups>. Acesso em: 05 dez. 2022.

DESAI, Jitendra D.; BANAT, Ibrahim M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DINIZ, Cesar *et al.* Brazilian mangrove status: Three decades of satellite data analysis. **Remote Sensing**, v. 11, n. 7, p. 808, 2019.

DONG, Zhi-Long; WANG, Bao-Shan; LI, Jie. Effects of petroleum hydrocarbon contamination on soil bacterial diversity in the permafrost region of the Qinghai-Tibetan Plateau. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 29, n. 3, p. 322-339, 2020.

EFFENDI, Agus Jatnika; KARDENA, Edwan; HELMY, Qomarudin. Biosurfactant-enhanced petroleum oil bioremediation. **Microbial action on hydrocarbons**, p. 143-179, 2018.

ESCUDERO-OÑATE, C.; MARTÍNEZ-FRANCÉS, E. A Review of Chitosan-Based Materials for the Removal of Organic Pollution from Water and Bioaugmentation. In: **Chitin-Chitosan - Myriad Functionalities in Science and Technology**. [s.l.] InTech, 2018.

EVANS, F. F. *et al.* Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, n. 2, p. 295–305, 2004.

FELIX, Anne Kamilly Nogueira *et al.* 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.

FERREIRA GREGORIO, Valeria; PIÉ, Laia; TERCEÑO, Antonio. A systematic literature review of bio, green and circular economy trends in publications in the field of economics and business management. **Sustainability**, v. 10, n. 11, p. 4232, 2018.

FREIRE, Carlos Torres; MARUYAMA, FELIPE; POLLI, Marco. Inovação e empreendedorismo: políticas públicas e ações privadas. **Novos estudos CEBRAP**, v. 36, p. 51-76, 2017.

GARG, Malvika; GUPTA, Suman. Startups and the growing entrepreneurial ecosystem. 2021.

GENTILI, A. R. et al. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 57, n. 4, p. 222–228, jun. 2006.

GIRI, Chandra et al. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, n. 1, p. 154-159, 2011.

GIUGNI, Diego; GIUGNI, Valter. Intellectual property: a powerful tool to develop biotech research. **Microbial biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 493-506, 2010.
GOUGH, Heidi L.; NIELSEN, Jeppe L. Bioaugmentation. **Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Pollution Mitigation and Waste Treatment Applications**, p. 105-115, 2017.

GOSWAMI, Pranab; SINGH, H. Devendra. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 1, p. 1-11, 1991.

GONG, H. *et al.* Petroleum hydrocarbon degrading bacteria associated with chitosan as effective particle-stabilizers for oil emulsification. **RSC Advances**, v. 5, n. 47, p. 37640–37647, 2015.

HAMDAN, Hamdan Z.; SALAM, Darine A. Microbial community evolution during the aerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in marine sediment microcosms: Effect of biostimulation and seasonal variations. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114858, 2020.

HOLGUIN, Gina; VAZQUEZ, Patricia; BASHAN, Yoav. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and fertility of soils**, v. 33, p. 265-278, 2001.
HSIEH, Feng-Ming *et al.* Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 83-92, 2008.

HUA, Fei; WANG, Hong Qi. Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 2, p. 165-175, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Instrução Normativa N° 5 , De 17 De Maio De 2010**. Estabelece os procedimentos e as exigências a serem adotados para efeito de registro, renovação de registro e anuência prévia para a realização de pesquisa e experimentação com produtos remediadores. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/registros/quimicos-e->

biologicos/remediadores-ambientais/registro-de-produtos-remediadores-ambientais. Acesso em: 05/12/2022.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 12, p. 4124-4126, 1949.

JENNERJAHN, Tim C.; ITTEKKOT, Venugopalan. Relevance of mangroves for the production and deposition of organic matter along tropical continental margins. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 23-30, 2002.

JIN, D. *et al.* Biodegradation of di-n-butyl phthalate by an isolated *Gordonia* sp. strain QH-11: Genetic identification and degradation kinetics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 221-222, p. 80-85, 2012.

JOHNSEN, Mads G.; HANSEN, Ole C.; STOUGAARD, Peter. Isolation, characterization and heterologous expression of a novel chitosanase from *Janthinobacterium* sp. strain 4239. **Microbial cell factories**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2010.
JURELEVICIUS, D. *et al.* The Use of a Combination of alkB Primers to Better Characterize the Distribution of Alkane-Degrading Bacteria. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-10, 2013.

KAREL, Steven F.; LIBICKI, Shari B.; ROBERTSON, Channing R. The immobilization of whole cells: engineering principles. **Chemical Engineering Science**, v. 40, n. 8, p. 1321-1354, 1985.

KHAN, M. A. I. *et al.* Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. **Chemosphere**, v. 212, p. 755-767, 2018.

KIM, H. S. *et al.* Characteristics of crude oil-degrading bacteria *Gordonia* iterans isolated from marine coastal in Taean sediment. **Microbiology Open**, v. 8, n. 6, p. 1-10, 2019.

KIM, S. H. *et al.* *Ketobacter alkanivorans* gen. Nov., sp. nov., an n-alkane-degrading bacterium isolated from seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 2258-2264, 2018.

KIM, Jinhwan; VALENTINE, Kristen. The innovation consequences of mandatory patent disclosures. **Journal of Accounting and Economics**, v. 71, n. 2-3, p. 101381, 2021.

KUMMER, C.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT, E. *Gordonia alkanivorans* sp. nov., isolated from tar-contaminated soil. **International Journal of Systematic Bacteriology** n. 49, p. 1513-1522, 1999.

LANGILLE, M. G.I.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J. G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; A REYES, J.; CLEMENTE, J. C.; BURKEPILE, D. E.; VEGA THURBER, R. L.; KNIGHT, R.; BEIKO, R. G.; and Huttenhower, C. Predictive functional profiling of

microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, 1-10. 8 2013.

LAW, Jodi Woan-Fei *et al.* A review on mangrove actinobacterial diversity: the roles of Streptomyces and novel species discovery. **Progress In Microbes & Molecular Biology**, v. 2, n. 1, 2019.

LENARDUZZI, Valentina; TAIBI, Davide. MVP explained: A systematic mapping study on the definitions of minimal viable product. In: **2016 42th Euromicro Conference on Software Engineering and Advanced Applications (SEAA)**. IEEE, p. 112-119, 2016.

LENHARD, G. Die dehydrogenaseaktivität des bodens als maß für die mikroorganismen-tätigkeit im boden. **Zeitschrift Für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde**, v. 73, n. 1, p. 1-11, 1956.

BRASIL. **Lei nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006**. Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Lei/L11428.htm. Acesso em: 09 jul. 2020.

BRASIL. **Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012**. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis nºs 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis nºs 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória nº 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12651.htm. Acesso em: 09 jul. 2020.

BRASIL. **Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998**. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm. Acesso em: 09 jul. 2020.

LIANG, Jun-Bin *et al.* Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. **Marine Biology**, v. 150, p. 739-747, 2007.

LIANG, Tzu-Wen *et al.* Purification of chitinase/chitosanase from *Bacillus cereus* and discovery of an enzyme inhibitor. **International journal of biological macromolecules**, v. 63, p. 8-14, 2014.

LIM, Mee Wei; VON LAU, Ee; POH, Phaik Eong. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil—present works and future directions. **Marine pollution bulletin**, v. 109, n. 1, p. 14-45, 2016.

LIU, Jiqing; BACOSA, Hernando P.; LIU, Zhanfei. Potential environmental factors affecting oil-degrading bacterial populations in deep and surface waters of the northern Gulf of Mexico. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2131, 2017.

LIU, H. *et al.* Distribution Characteristics of Bacterial Communities and Hydrocarbon Degradation Dynamics During the Remediation of Petroleum-Contaminated Soil by Enhancing Moisture Content. **Microbial Ecology**, v. 80, n. 1, p. 202–211, 2020.

LIU, X. *et al.* Shift in bacterial community structure drives different atrazine-degrading efficiencies. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, p. 1–11, 2019.

LUO, L. *et al.* Influence of mangrove roots on microbial abundance and coenzyme activity in sediments of a subtropical coastal mangrove ecosystem. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 132, n. April, p. 10–17, 2018.

MACHADO, Laís Feitosa *et al.* Tracking mangrove oil bioremediation approaches and bacterial diversity at different depths in an in situ mesocosms system. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2107, 2019.

MAITI, S. K.; CHOWDHURY, A. Effects of Anthropogenic Pollution on Mangrove Biodiversity: A Review. **Journal of Environmental Protection**. v. 04, n. 12, p. 1428–1434, 2013.

MANKINS, John C. *et al.* Technology readiness levels. **White Paper, April**, v. 6, n. 1995, p. 1995, 1995. Edited em 2004.

MARCOLIN, Federica; VEZZETTI, Enrico; MONTAGNA, Francesca. How to practise Open Innovation today: what, where, how and why. **Creative Industries Journal**, v. 10, n. 3, p. 258-291, 2017.

MATOS, Felipe; RADAELLI, Vanderleia. Ecossistema de startups no Brasil: Estudo de caracterização do ecossistema brasileiro de empreendedorismo de alto impacto. **Banco Interamericano de Desenvolvimento (BID)**, 2020.

MENÉNDEZ, P.; LOSADA, I. J.; TORRES-ORTEGA, S.; NARAYAN, S.; BE CK, M. W. (2020). **The Global Flood Protection Benefits of Mangroves**. Nature, Scientific Reports. 10:4404. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61136-6>. Acesso em: 14 jan. 2021.

MEYER, D. D. *et al.* Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 95, p. 356–363, 2014.

MUTHUSAMY, Krishnaswamy *et al.* Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current science**, p. 736-747, 2008.

HOFF, Rebecca. **Oil spills in mangroves: planning & response considerations**. National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA Ocean Service, Office of Response and Restoration, 2002.

MAITI, Subodh Kumar; CHOWDHURY, Abhiroop. Effects of anthropogenic pollution on mangrove biodiversity: a review. **Journal of Environmental Protection**, v. 2013, 2013.

MARGESIN, Rosa; SCHINNER, Franz. Biological decontamination of oil spills in cold environments. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 381-389, 1999.

MARTIN, Marcel. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, [S.l.], v. 17, n. 1, p. pp. 10-12, may 2011. ISSN 2226-6089. Disponível em: <http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200>. Data de acesso: 24 apr. 2021. doi:<https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.

MICHEL, Jacqueline; RUTHERFORD, Nicolle. Impacts, recovery rates, and treatment options for spilled oil in marshes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 82, n. 1-2, p. 19-25, 2014.

MILLER, J. I. *et al.* Oil hydrocarbon degradation by caspian sea microbial communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 1–15, 2019.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2018). Atlas dos Manguezais do Brasil / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

MORALES-GUZMÁN, Daniel *et al.* Microbial prospection of communities that produce biosurfactants from the water column and sediments of the Gulf of Mexico. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 68, n. 6, p. 1202-1215, 2021.

MOYO, F. *et al.* Sorption of hydrophobic organic compounds on natural sorbents and organoclays from aqueous and non-aqueous solutions: A mini-review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 5, p. 5020–5048, 2014.

MUTHUSAMY, Krishnaswamy *et al.* Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current science**, p. 736-747, 2008.

VIJAYAKUMA, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 181, 2015.

NWANKWEGU, Amechi S. *et al.* Reclamation of DPK hydrocarbon polluted agricultural soil using a selected bulking agent. **Journal of environmental management**, v. 172, p. 136-142, 2016.

OCHOA-GÓMEZ, Jonathan G. *et al.* Mangrove wetland productivity and carbon stocks in an arid zone of the Gulf of California (La Paz Bay, Mexico). **Forest ecology and management**, v. 442, p. 135-147, 2019.

PANIAGUA-MICHEL, J. Bioremediation of Marine Effluents and Environments. In: **Encyclopedia of Marine Biotechnology**. [s.l.] Wiley, 2020. p. 3119–3137.

PARTOVINIA, A.; RASEKH, B. Review of the immobilized microbial cell systems for bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted environments. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 1–38, 2018.

PELAGE, Latifa *et al.* Coastal land use in Northeast Brazil: mangrove coverage evolution over three decades. **Tropical Conservation Science**, v. 12, p. 1940082918822411, 2019.

PIDGORSKYI, V. S.; NOGINA, T. M. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Actinobacteria and Acinetobacteria Strains Producing Biosurfactant. **Mikrobiolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1993)**, v. 78, n. 6, p. 92–103, 2016.

POWELL, S. M. *et al.* The importance of soil characteristics to the structure of alkane-degrading bacterial communities on sub-Antarctic Macquarie Island. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 2012–2021, 2010.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RENEGAR, D. Abigail *et al.* Tropical Oil Pollution Investigations in Coastal Systems [TROPICS]: A 32-year Review of Response and Recovery. In: **International Oil Spill Conference**. 2021. p. 688277.

RIBICIC, D. *et al.* Microbial community and metagenome dynamics during biodegradation of dispersed oil reveals potential key-players in cold Norwegian seawater. **Marine Pollution Bulletin**, v. 129, n. 1, p. 370–378, 2018a.

ROGNES, T., FLOURI, T., NICHOLS, B., QUINCE, C., & MAHÉ, F. (2016). VSEARCH: a versatile opensource tool for metagenomics. **PEERJ**. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

ROSENBERG, E. *et al.* The prokaryotes: Deltaproteobacteria and epsilonproteobacteria. **The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria**, v. 9783642390, p. 1–413, 2014.

ONYENA, Amarachi Paschaline; SAM, Kabari. A review of the threat of oil exploitation to mangrove ecosystem: Insights from Niger Delta, Nigeria. **Global ecology and conservation**, v. 22, p. e00961, 2020.

PAINEL BRASILEIRO DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS (PBMC) (2017). **Impacto, vulnerabilidade e adaptação das cidades costeiras brasileiras às mudanças climáticas**: Relatório Especial do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas [Marengo, J. A., Scarano, F. R. (Eds.)]. PBMC, COPPE - UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil. 184 p. ISBN: 978-85-285-0345-6.

PATEL, Ramesh N. *et al.* Microbial oxidation of hydrocarbons: properties of a soluble methane monooxygenase from a facultative methane-utilizing organism, *Methylobacterium* sp. strain CRL-26. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1130-1137, 1982.

PARADA, Alma E.; NEEDHAM, David M.; FUHRMAN, Jed A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403-1414, 2016.

PYLRO, Victor; ROESCH, Luiz. The Brazilian Microbiome. **Current status and perspectives. Switzerland: Springer International Publishing**, p. 21-39, 2017.

RIES, E. **A Startup Enxuta. Como utilizar a inovação contínua para criar negócios bem sucedidos**. Editora Sextante; 1ª edição, 2019.

SÁ, Maria da Conceição Aquino *de et al.* Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, p. 265-268, 2013.

SANTOS, H. F. *et al.* Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 216, n. 1–4, p. 329–350, mar. 2011.

SANTOS, Danyelle Khadydja F. *et al.* Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SIERRA-GARCIA, Isabel Natalia; DE OLIVEIRA, Valéria Maia. Microbial hydrocarbon degradation: efforts to understand biodegradation in petroleum reservoirs. **Biodegradation-engineering and technology**, v. 10, p. 55920, 2013.

SINGH, Ajay; VAN HAMME, Jonathan D.; WARD, Owen P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 1, p. 99-121, 2007.

SHAH, Vishal (Ed.). **Emerging environmental technologies, volume II**. Springer Science & Business Media, p 147-169, 2010.

SHAHI, A. *et al.* Reconstruction of bacterial community structure and variation for enhanced petroleum hydrocarbons degradation through biostimulation of oil contaminated soil. **Chemical Engineering Journal**, v. 306, p. 60–66, 2016.

SHEN, F. T. *et al.* Molecular detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monoxygenase gene from *Gordonia* spp. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 53–59, 2010.

SHINTANI, M. *et al.* Biodegradation of A-fuel oil in soil samples with bacterial mixtures of *Rhodococcus* and *Gordonia* strains under low temperature conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xx, n. xx, p. 3–5, 2018.

SOARES, Marcelo de Oliveira *et al.* Oil spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and governmental disaster. **Marine Policy**, v. 115, p. 103879, 2020.

STANINSKA-PIĘTA, J. *et al.* The impact of natural and synthetic surfactants on bacterial community during hydrocarbon biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 142, n. March, p. 191–199, 2019.

TAKASUKA, Taichi E. *et al.* Structure-guided analysis of catalytic specificity of the abundantly secreted chitosanase SACTE_5457 from *Streptomyces* sp. SirexAA-E. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 82, n. 7, p. 1245-1257, 2014.

TAKEUCHI, M. *et al.* *Methyloceanibacter caenitepidi* gen. nov., sp. nov., a facultatively methylotrophic bacterium isolated from marine sediments near a hydrothermal vent. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 2, p. 462–468, 2014.

TIRALERDPANICH, P. *et al.* Potential microbial consortium involved in the biodegradation of diesel, hexadecane and phenanthrene in mangrove sediment explored by metagenomics analysis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, n. March, p. 595–605, 2018.

THALMANN, A. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). **Landwirtsch. Forsch.**, v. 21, p. 249-258, 1968.

TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R.; DE CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 231–241, 2011.

UNESCO (2019). UNESCO afirma que manguezais são aliados do ser humano na luta contra as mudanças climáticas. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/unesco-afirma-quemanguezais-sao-aliados-do-ser-humano-na-luta-contras-as-mudancas-climaticas/>>. Acesso em: 26 jun. 2020.

URBANCZYK, Henryk; AST, Jennifer C.; DUNLAP, Paul V. Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 2, p. 324-342, 2011.

VAN DER WAARDE, Jaap J. *et al.* Enzyme assays as indicators for biodegradation. In: **Contaminated Soil'95: Proceedings of the Fifth International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, 30 October–3 November 1995, Maastricht, The Netherlands**. Springer Netherlands, 1995. p. 1377-1378.

VARJANI, Sunita J.; UPASANI, Vivek N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 120, p. 71-83, 2017.

VARJANI, Sunita J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.

VIGGOR, Signe *et al.* Occurrence of diverse alkane hydroxylase *alkB* genes in indigenous oil-degrading bacteria of Baltic Sea surface water. **Marine Pollution Bulletin**, v. 101, n. 2, p. 507-516, 2015.

VILLELA, H. D. M. *et al.* Microbial bioremediation of oil contaminated seawater: A survey of patent deposits and the characterization of the top genera applied. **Science of the Total Environment**, v. 666, p. 743–758, 2019.

WANAPAIKAN, P. *et al.* Synergistic degradation of pyrene by five culturable bacteria in a mangrove sediment-derived bacterial consortium. **Journal of Hazardous Materials**, 2018.

WANG, Xing-Biao *et al.* Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. **Bioresource technology**, v. 102, n. 17, p. 7755–7761, 2011.

WIESER, M. *et al.* Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos *et al.* 1974). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 629–637, 2002.

WINSOR, P. A. An electrical effect in liquid crystalline solutions containing amphiphilic salts. **Nature**, v. 173, p. 81–81, 1954.

WU, M. *et al.* Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 223, p. 657–664, 2017.

XU, Xingjian *et al.* Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2885, 2018.

YAKIMOV, M. M. *et al.* Marine, Aerobic Hydrocarbon-Degrading Gammaproteobacteria: The Family Alcanivoracaceae. **Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes**, p. 1–13, 2019.

YUAN, Ye *et al.* Effect of an electric field on n-hexadecane microbial degradation in contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 77, p. 78–84, 2013.

ZITOUNI, Mina *et al.* Biochemical and molecular characterization of a thermostable chitosanase produced by the strain *Paenibacillus* sp. 1794 newly isolated from compost. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, p. 5801–5813, 2013.

ANEXO A – PATENTE DO PRODUTO BIOCLINEX DEPOSITADA JUNTO AO INPI.

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2022 015108 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 07272636000131

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av da universidade, 2853 - Benfica

Cidade: Fortaleza

Estado: CE

CEP: 60710-780

País: Brasil

Telefone: (85) 3366-9434

Fax: (85) 3366-9941

Email: patentes@ufc.br**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 29/07/2022 às 14:33, Petição 870220067248