

Universidade de São Paulo
Instituto de Geociências

**FLUXO, CONTROLE E ASSINATURA ISOTÓPICA DO CH₄ e CO₂
DAS ACUMULAÇÕES DE PETRÓLEO BIODEGRADADO DA
FORMAÇÃO PIRAMBÓIA, BACIA DO PARANÁ**

Monografia de Trabalho de Formatura

(TF 18/31)

Aluna: Maria Rogieri Pelissari

Orientador: Prof. André Oliveira Sawakuchi

Co-orientadora: Nazaré Almeida



São Paulo
2018

*Dedico carinhosamente esse trabalho à minha avó,
a qual eu cresci nutrindo a curiosidade de conhecer,
com a certeza de ter sido o melhor que poderia ser.*

AGRADECIMENTOS

Ao fim de uma jornada está o início de outra, tão ou mais grandiosa quanto, num ciclo eterno. Agradeço aos que encontrei ao longo dessa aventura, e a cada um deles, individualmente. Acredito que todos têm um propósito de cruzar nossos caminhos e nos ensinar algo de certa forma, então obrigada pelos ensinamentos e espero ainda muito aprender.

Agradeço principalmente à minha família Proauto, por tudo. A arte de criar e educar é árdua e sou eternamente grata pela perfeição e carinho com a qual a exerceram e continuam a exercer, mãe e pai. E ter um irmão como você é sinônimo de ter um anjinho em minha vida, hermano.

Agradeço também a todos os professores e técnicos esportivos que já tive ao longo dessa vida. A missão de ensinar é algo a ser muito apreciado e espero que sigam com forças para continuar nessa luta que é transmitir o conhecimento e, muitas vezes, formar caráter, ideologia vida e inúmeras coisas que não se restringem às 4 paredes das salas de aula. Gostaria de agradecer especificamente ao professor André Oliveira Sawakuchi por pacientemente me orientar ao longo de praticamente toda a Graduação, bem como à toda equipe do LEGAL, que muito me ensinaram, ajudaram e corrigiram. Especialmente ao Henrique, Nazaré, Victor, Marcelo, Dailson e Laura, um baita grupo de estudos!

Agradeço também ao programa PFHR-241 da Petrobrás pelo auxílio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desse projeto, ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pela disponibilidade de utilização do laboratório nas etapas iniciais dos estudos e também ao Laboratório de Isótopos Estáveis da UC Davis - Califórnia, pela realização das medidas isotópicas. Um agradecimento especial ao grupo de funcionários da Silesian University of Technology (SUT) que me receberam tão bem e me ajudaram tanto em meu período de estadia na aconchegante cidade de Gliwice, na Polônia, e aos funcionários da USP no geral.

Por fim, um carinho especial aos amigos que fiz, dos mais diversos ambientes, nos mais diferentes propósitos, cada um com sua qualidade e valores únicos. Geologistas, vocês foram a melhor turma que eu poderia ter tido. Amigos do Catadão, saibam que contribuíram para que a natação seguisse sendo uma paixão e sinônimo de alegria e boas amizades para mim. Aos meus 15 amigos rondonistas, apenas meu muito obrigada e minhas saudades sempre de nós juntos. E ao melhor time de basquete que já tive: obrigada por despertarem uma nova paixão em mim.

Murta, Pinga, Eunuco, Porka, Mari, Juru, Peps, Mila, Xica, Kiwi, Willy, Rega, Aids, Bug, Sis, Bambi, Pika, Mãe Loka, Bandida, Byto, Nômade, Bago, Gui, Ronaldo, Xita, Come, vocês fizeram da Geologia um verdadeiro berço de boas amizades. E aos meus amigos do mundo, em especial à Mafalda, Catherine, Paola, Victor, Lauri, Cano, Erick e Ozlêm, que nossos incríveis momentos juntos sejam sempre motivos suficientes para reencontros futuros.

Um agradecimento especial à todas as mulheres que já cruzaram meu caminho e me ajudaram a abrir os olhos para o que nos remete, me ensinando a acreditar que devemos nos valorizar e apoiar sempre e ao máximo, pois se não o fizermos, ninguém mais o fará. E à todos os mulherões que me servem de inspiração nessa vida (mãe, a começar por você!).

RESUMO

Os processos de produção biogênica de CH₄ e CO₂ têm sua relevância não apenas para questões ambientais, no que diz respeito à emissão de gases que intensificam o efeito estufa, mas também no cenário energético, visto que a geração de CH₄ a partir da biodegradação de compostos orgânicos pode ser associada à formação de reservas de gás natural ao longo do tempo.

Este trabalho buscou avaliar a influência de condições ambientais, tais como presença de água e concentração de sulfato, no processo de geração de CH₄ e CO₂ devido à biodegradação de petróleo em arenitos, assim como estimar taxas de geração e emissão destes gases para a atmosfera.

Para alcançar os objetivos propostos, foram realizados experimentos de incubação em *vials* a partir de amostras de arenito (Formação Pirambóia, Bacia do Paraná) impregnadas com hidrocarbonetos de alta viscosidade. Estas rochas são portadoras de petróleo pesado e ocorrem na borda leste da Bacia do Paraná, no Estado de São Paulo.

Foi notável a influência da água no processo de geração biogênica de CH₄ e CO₂, uma vez que os valores de produção obtidos foram maiores para os experimentos em condições úmidas, se comparados aos experimentos sob condições secas. Quanto ao sulfato de cálcio (gipsita), os experimentos realizados demonstram que, nas concentrações avaliadas, que seriam próximas às condições naturais, a presença de sulfato não influenciou na geração biogênica destes gases. Os experimentos de incubação realizados indicam valores crescentes das concentrações de CH₄ e CO₂ ao longo do tempo, com produção média de 16,6ml/ano de CH₄ por tonelada de arenito, ou cerca de 100 mil litros/ano de CH₄, se considerada as ocorrências de arenitos com petróleo pesado da área de estudo.

Além disso, foram realizadas análises isotópicas dos gases obtidos para definição da assinatura do δ¹³C, de forma a buscar esclarecimento de sua origem, se biogênica ou com eventual presença de gases termogênicos herdados da fase de soterramento dos arenitos. Essas análises indicam uma assinatura mais pesada do carbono (-24‰ para δ¹³C_{CO2} e -50‰ para δ¹³C_{CH4}, em relação ao V-PDB) do que era esperado para CH₄ e CO₂ biogênicos. Isso poderia ser explicado pela eventual presença de gases termogênicos ainda retidos nos arenitos e/ou pelo caráter isotópico do petróleo pesado precursor dos gases gerados.

¹ Padrão V-PDB (Vienna PeeDee Belemnite).

ABSTRACT

Processes controlling the biogenic production of CH₄ and CO₂ have relevance not only to environmental issues related to greenhouse gases emissions, but also in the energy scenario, since the biogenic generation of CH₄ can be associated with the formation of natural gas reserves over time.

This work aimed to evaluate the influence of environmental conditions, such as the presence of water and sulfate concentration, in the process of CH₄ and CO₂ generation from oil biodegradation in sandstones, as well as to estimate rates of generation and emission of these gases to the atmosphere.

In order to reach the proposed objectives, incubation experiments were carried out using samples of tar sandstones (Pirambóia Formation, Paraná Basin) impregnated with high viscosity hydrocarbons. These tar sandstones outcrop on the eastern border of the Paraná Basin, in the State of São Paulo.

The influence of water in the biogenic generation of CH₄ and CO₂ was remarkable, since the obtained values were higher for the experiments under wet conditions (water saturated samples), when compared to experiments performed under dry conditions. Incubation experiments with addition of calcium sulfate (gypsum) demonstrated that the presence of calcium sulfate did not influence the biogenic generation of CH₄ and CO₂. Incubation experiments indicated increasing concentrations of CH₄ and CO₂ over time, with a mean production rate of 16.6 ml/year of CH₄ per ton of sandstone, or about 100 thousand liters/year of CH₄, considering the volume of heavy oil in the tar sandstones of the study area.

In addition, carbon isotopic ($\delta^{13}\text{C}$) analysis was carried out in order to constrain the origin of the CH₄ and CO₂, if biogenic or with possible presence of thermogenic gases inherited from the sandstone burial phase. The $\delta^{13}\text{C}$ results indicated a relatively heavy carbon signature (-24 ‰ for $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$ and -50 ‰ for $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$, relative to the V-PDB standard¹) than expected for biogenic CH₄ and CO₂. This could be explained by the presence of thermogenic gases still retained in the sandstones and/or by the isotopic character of the heavy oil acting as precursor of biogenic generated gases.

¹ V-PDB Standard (Vienna PeeDee Belemnite).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	7
3. JUSTIFICATIVA	7
4. TRABALHOS PRÉVIOS	9
4.1. Sistema Petrolífero Irati-Pirambóia	9
4.2. Origem do CH₄ e o processo de biodegradação	10
4.3. Estudos Isotópicos de δ¹³C	12
5. MATERIAIS E MÉTODOS	13
5.1. Amostragem	13
5.2. Preparação dos experimentos de incubação para produção de CH₄ e CO₂	17
5.3. Determinação da concentração de CH₄ e CO₂ por cromatografia gasosa	18
5.4. Medições de pH	19
5.5. Análises Isotópicas	20
6. RESULTADOS OBTIDOS	20
6.1. Análise Granulométrica Por Difração a Laser	20
6.2. Análise de pH	21
6.3. Resultados da Cromatografia Gasosa	24
6.3.1. Avaliação da emissão natural de gases in situ	24
6.3.2. Avaliação da influência da presença de água na geração de CH₄	24
6.3.3. Avaliação da influência da presença de água na geração de CO₂	26
6.4. Análise de correlação e coeficiente de correlação de Pearson para CH₄ e CO₂	32
6.4.1. Experimento para avaliação da influência da água	32
6.4.2. Experimento para avaliação da influência do sulfato	34
6.5. Resultado das análises isotópicas	36
7. INTERPRETAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	37
8. CONCLUSÕES	41
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

Dado o cenário de mudança climática exigindo esforço global para a redução da emissão de gases de efeito estufa, e sabendo que o CH₄ tem potencial de aquecimento global até 28 vezes maior que o CO₂ (IPCC, 2014), é importante que sejam compreendidos os fatores controladores de suas produções naturais e *input* de diferentes fontes para a atmosfera. O metano é também o principal hidrocarboneto presente na atmosfera terrestre, com uma concentração global média de 1,7 ppm, enquanto que a do CO₂ é de 390.5 ppm (Dlugokencky, 1994). Modelos de *budget* de metano levantados no relatório do IPCC (2013), a partir de diferentes fontes e sumidouros, estimam emissões globais de CH₄ para diversos ambientes, inclusive geológicos. No entanto, gerações de gases a partir da biodegradação de conteúdos petrolíferos não são levadas em conta nas estimativas, o que lhes confere caráter subestimado e confirma a importância ambiental de se avaliar essas produções biogênicas de gases.

Uma vez que a biodegradação de petróleo é tida como potencial fonte de CO₂ e CH₄ e sabendo das acumulações rasas de petróleo da Formação Pirambóia, as mesmas se mostram como excelente caso para estudos relacionados a tais emissões, levando-se em conta outras acumulações análogas ao redor do mundo, como *tar sands* no Canadá e Venezuela, para as quais poderiam ser feitas extrapolações dos resultados obtidos neste trabalho, se mantidas as proporções e condições.

Além disso, cerca de 20% das reservas de gás natural do mundo são formadas a partir de gases de origem biogênica, (Rice, 1992), sendo o metano o principal hidrocarboneto gerado no processo de biodegradação anaeróbia de petróleo (Jones et al., 2008).

A Formação Pirambóia, dentro da Bacia do Paraná, é composta por arenitos médios e finos, dispostos em sequências de estratificações cruzadas métricas, associadas a um sistema deposicional eólico úmido, com fácies de depósitos interdunas bem marcadas em lentes de siltitos e argilitos intercaladas com as séries de arenitos com estratificações cruzadas (Caetano-Chang, 1997). Os afloramentos da área de estudo na borda leste da Bacia do Paraná possuem aspecto escuro e asfáltico (arenitos asfálticos), dado o caráter pesado do petróleo disseminado nos arenitos (aproximadamente 5° API), de alta viscosidade e com médio a alto teor de enxofre (2 a 3% em peso) (Thomaz Filho et al., 2008).

O petróleo da Formação Pirambóia é proveniente dos folhelhos pirobetuminosos da Formação Irati, constituindo o Sistema Petrolífero Irati-Pirambóia (Thomaz Filho, 1982), e seria associado a fortes processos de biodegradação, correlacionáveis a uma geração de gás metano

(CH₄) e dióxido de carbono (CO₂) como produtos metabólicos finais da biodegradação por microrganismos anaeróbios, como as *Archaeas* (Cabral, 2006),

Fatores naturais como presença de água, sulfato, acetato, íons metálicos ou variação de temperaturas no substrato, podem exercer influência positiva ou negativa no processo de biodegradação. O sulfato apresenta-se como importante componente da cimentação em arenitos e rochas sedimentares, sendo muitas vezes formado a partir da oxidação de minerais sulfetados e precipitação durante a mesodiagenese (Bloch, 1994), além de atuar como um acceptor de elétrons por bactérias sulfato redutoras no processo de degradação de matéria orgânica (Colleran et al., 1995). A redução do sulfato, por sua vez, é associada à acidificação do meio (Reis et al., 1991), reduzindo o pH da solução. Além disso, em unidades sedimentares próximas da superfície é comum a presença de água.

Compreender como esses fatores atuam se torna fundamental para a caracterização da geração biogênica de CH₄ e CO₂. Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar a influência dessas do sulfato e da água no processo de biodegradação de petróleo, em matriz de arenitos asfálticos.

2. OBJETIVOS

Este projeto tem como principais objetivos a avaliação das taxas de produção potencial dos gases metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), oriundos da biodegradação de petróleo acumulado nos arenitos eólicos da Formação Pirambóia, dentro do sistema petrolífero Irati-Pirambóia da Bacia do Paraná, bem como a investigação da influência da quantidade de água e sulfato nesse processo.

Objetivos secundários foram quantificar a emissão desses gases para a atmosfera, procurando entender o papel da biodegradação de petróleo no balanço de gases estufa, em escala local; estimar a produção e o fluxo de CH₄ e CO₂ ao longo do tempo; e definir a origem dos gases obtidos, a partir da caracterização isotópica de δ¹³C dos gases.

3. JUSTIFICATIVA

Os arenitos asfálticos, do inglês “tar sands”, são arenitos com acumulações de petróleo considerado pesado, com alta viscosidade, geralmente menor que 10^o API (American Petroleum Institute), que atribui aos reservatórios o caráter não-convencional. Tais acumulações têm conquistado cada vez mais espaço no mercado energético mundial, principalmente em países

como Canadá, Rússia e Venezuela, onde podem ser classificadas como reservas, visto que atingem a viabilidade econômica para produção (BP Statistical Review, 2017).

No Canadá, por exemplo, a produção de petróleo a partir dessas reservas já atingiu valores maiores que 40% da produção anual total de petróleo, com produção de cerca de 1,1 milhões de barris por dia e reservas na ordem de 1,7 trilhões de barris de óleo em *tar sands* em 2014, de acordo com relatórios anuais na página virtual do WEC (World Energy Council).

No Brasil, os arenitos asfálticos da Formação Pirambóia representam caso semelhante, de menores dimensões. A disponibilidade de conteúdo orgânico pode ser entendida não só como uma possível fonte energética, mas também como cenário para um processo de biodegradação generalizado, dadas as baixas profundidades dos reservatórios, gerando gases tais como CH₄ e CO₂ (Thomaz Filho, 1982). Assim, acumulações da Formação Pirambóia serviriam para um estudo de caso cujos resultados contemplariam também, de forma indireta, reservatórios globais análogos.

Acumulações de CH₄ podem constituir reservas de gás natural e fontes naturais de gases de efeito estufa (CH₄ e CO₂) (Rice, 1993). Além disso, há um restrito número de estudos sobre CH₄ proveniente de biodegradação de petróleo, sendo um tema recente e recorrente, com grande potencial, dada a importância ambiental e econômica do mesmo.

Sendo assim, a quantificação de possíveis fluxos para a atmosfera de CH₄ e CO₂ gerados pela biodegradação de petróleo em acumulações de *tar sands* da Formação Pirambóia e a caracterização de parâmetros controladores de sua produção e da composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) destes gases auxiliariam no entendimento dos processos de biodegradação de petróleo e consequente produção e emissão de gases. Os resultados obtidos para a Formação Pirambóia poderiam ser extrapolados, consideradas limitações relacionadas a diferentes contextos geológicos ou climáticos, para sistemas análogos e outras formações ao redor do globo.

Posto isto, o presente trabalho busca colaborar para a compreensão do impacto desses processos, tanto no aspecto de contribuição para o efeito estufa, quanto no aspecto econômico, auxiliando na possível avaliação de viabilidade de produção energética a partir de concentrações de CH₄ de origem biogênica.

4. TRABALHOS PRÉVIOS

4.1. Sistema Petrolífero Irati-Pirambóia

De acordo com Milani, et al. (2001), um sistema petrolífero "compreende a existência e o funcionamento síncronos de quatro elementos (rochas geradoras maduras, rochas reservatório, rochas selantes e trapas) e dois fenômenos geológicos dependentes do tempo (migração e sincronismo)".

Dentre as unidades englobadas pela Bacia do Paraná, o presente projeto tem como foco a Formação Pirambóia (Soares,1975). A citada formação é um importante reservatório de petróleo da Bacia do Paraná, tendo sido alvo de pesquisa desde 1897, quando Auguste Collon realizou estudos numa área no Morro do Bofete (Rodovia Castelo Branco, km 173,5 sentido capital-interior). Na formação, a litologia predominante é de arenitos fino-médios, bem selecionados, com estratificações cruzadas acanaladas de grande porte, até 1,5m de espessura, com adelgaçamento no topo e na base das séries, com fácies interdunas bem marcadas em níveis mais argilosos com estratificações plano-paralelas intercalados na sequência, com até 1m de espessura, associados a um sistema deposicional eólico úmido, (Caetano-Chang, 1997).

Como peculiaridade de tais arenitos, destaca-se a coloração escura de alguns afloramentos da borda leste da bacia no Estado de São Paulo, devido à concentração de hidrocarbonetos pesados, provenientes de folhelhos pirobetuminosos da Formação Irati, estratigraficamente inferior (Thomaz Filho, 1982). No geral, as impregnações de petróleo se dão na fácies duna, enquanto a fácies interduna desempenha a função de selante interna dentro do sistema petrolífero, dadas as maiores concentrações de material pelítico.

O sistema petrolífero Irati-Pirambóia tem, portanto, os folhelhos pirobetuminosos da Formação Irati como rocha geradora, cuja migração de hidrocarbonetos através de fraturas, falhas e diques ao longo da bacia, geraria acumulações nos arenitos da Formação Pirambóia, com selos internos de fácies pelíticas de zonas interdunas, segundo Thomaz Filho (1982). A Formação Pirambóia caracteriza-se como reservatório do sistema petrolífero Irati-Pirambóia, cuja acumulação de óleo é estimada em cerca de 5,7 milhões de barris de petróleo somente na área de Anhembi (Thomaz Filho, 1982), considerando um teor médio de 5,5% de óleo em peso (Grossi Sad e Saraiva, 1981). Hettich (1981) estima que no total as ocorrências somam cerca de 26 milhões de barris de óleo, totalizando um volume de cerca de 32 milhões de barris mineráveis na formação.

Esse óleo é tido como imaturo, com altos teores de enxofre (2 a 3% em peso) e de alta viscosidade (5º API) (Tomaz Filho, 1982), constituindo um ambiente ideal para a ocorrência de

biodegradação, o que traria como resultado a produção de CH₄ e CO₂, podendo contribuir positivamente para o aumento dos gases efeitos estufa na região.

4.2. Origem do CH₄ e o processo de biodegradação

De acordo com Roadifer (1987), a maioria dos reservatórios de petróleo em subsuperfície do mundo seria afetada por processos de biodegradação, sendo esses predominantes em reservatórios rasos (Winters et al, 1969), com dominância da degradação de hidrocarbonetos sob condições anaeróbicas (Head et al., 2003).

Em bacias sedimentares o gás metano pode ser originário de processos termogênicos ou biogênicos e reservas de gás natural podem conter misturas de gases de diferentes fontes (Whiticar, 1999). O CH₄ termogênico, fruto da produção química termocatalítica a partir do aquecimento acima de 120°C de querogênio, pirólise ou reações inorgânicas com rochas ultramáficas, origina-se da alteração térmica da matéria orgânica disseminada nas rochas sedimentares, sendo o metano o produto final (Schoell, 1980). Por outro lado, a geração biogênica requer ambientes sob condições anóxicas, com disponibilidade de CO₂ e baixas concentrações de sulfato (Oremland, 1988), sob temperaturas entre 9°C e 110°C (Kotelnikova et al., 1998).

Assim, a produção microbial do CH₄ resulta da biodegradação anaeróbica de compostos e é associada a processos de fermentação do acetato (CH₃COOH → CH₄ + CO₂) e redução do CO₂ (CO₂ + 4H₂ → CH₄ + 2H₂O), os quais podem operar simultaneamente, mas são quantitativamente importantes em diferentes estágios da deposição do conteúdo orgânico, sendo que a redução do CO₂ opera principalmente em reservatórios de gás e sedimentos de deposição mais antiga (Claypool e Kaplan, 1974, Schoell, 1980). Ambientes anóxicos, com grande disponibilidade de material orgânico e altas porosidades, são favoráveis à ocorrência da biodegradação (Reinhart e Townsend, 1997), o que ocorre com maior frequência em profundidades rasas, até 3km, considerando-se um gradiente geotérmico de aproximadamente 30°C/km.

A produção biogênica de CH₄ é atualmente creditada às *Archaea* (ou *arqueas*) metanogênicas, as quais são tolerantes aos mais inóspitos ambientes, podendo ser halofílicas, adaptadas a ambientes hipersalinos, ou termofílicas, sobrevivendo em altas temperaturas (Rice, 1993). A metanogênese, por sua vez, tem sido descrita em uma série de ambientes anóxicos, incluindo reatores de biogás, sedimentos marinhos e aquáticos, pântanos, áreas alagadas, solos de tundra, aterros sanitários, e em tratos gastrointestinais animais (Balch et al., 1979, Whitman et al., 1991).

Processos de biodegradação levam à diminuição do teor de hidrocarbonetos saturados e do grau API (American Petroleum Institute), além de crescente aumento da densidade e da viscosidade, o aumento no conteúdo de asfaltenos, teor de enxofre, metais (como Ni e Va) e acidez do óleo, de acordo com Huang et al. (2004). O gás metano é o principal hidrocarboneto formado durante a biodegradação de petróleo, ainda que estudos de Bokova (1953) tenham indicado também a formação de pequenas quantidades de gases C²⁺.

Dessa forma, para a ocorrência de tais processos, é necessário que sejam atingidas condições tais como: temperaturas menores que 110°C; presença de água ou outro tipo de acceptor elétrico (Fe, SO₄, N, Mn) em contato com o óleo; presença de microorganismos e nutrientes, tais como nitratos e fosfatos (Connan, 1984; Head et al., 2003).

Durante a biodegradação de compostos, sob condições anaeróbias, a disponibilidade desses aceptores de elétrons é fundamental, sendo preferencialmente utilizados aqueles com maior potencial redox, como NO₃⁻, seguido por Fe(III), SO₄²⁻ e CO₂, por exemplo (Lueders e Friedrich, 2002). De acordo com Colleran et al. (1995), o sulfato se faz como um acceptor de elétrons para bactérias sulfato redutoras em ambientes onde há a degradação anaeróbica de compostos orgânicos. Sendo assim, a redução de sulfato é associada a uma acidificação do meio, na presença de matéria orgânica (Reis et al., 1991). Dessa forma, seria esperada a redução do pH nos experimentos de incubação na presença de sulfato ao longo do tempo.

Segundo Milkov (2011), estima-se que 65.500tcf¹ de metano de origem microbial, associado à biodegradação, podem ter sido gerados em acumulações de petróleo e betume ao redor do mundo, ao longo da história geológica. Desses, cerca de 845-1644 tcf seriam acumulações de metano *in situ* recuperáveis, na forma livre ou dissolvida em reservas de petróleo, o que representa cerca de 5-11% do gás convencional global recuperável (Milkov, 2011). Ainda segundo o autor, a maior parte desse volume gerado seria possivelmente oxidada para CO₂, seja sob condições aeróbias ou anaeróbias; porém, uma porção poderia ser emitida para a atmosfera e influenciar no clima global.

Assim, os arenitos impregnados com hidrocarbonetos pesados disseminados da Formação Pirambóia se apresentam como ambiente ideal para a ação desses microorganismos. De fato, estudos de Cabral (2006) indicam a ação de fortes processos de biodegradação na unidade.

Além disso, a presença de inclusões fluidas de hidrocarbonetos em veios de calcita, preenchendo fraturas da Formação Irati, aponta também para a existência de gases de origem termogênica, indicando que a rocha geradora da Formação Irati teria sido submetida a condições dentro da janela de maturação de gás, e, portanto, o óleo pesado acumulado na Formação Pirambóia não seria originalmente pesado, o que reafirma possíveis processos de biodegradação (Oliveira, 2012).

¹ tcf = Unidade de medida (Trillion Cubic Feet), equivalente a $2,8 \text{ E}^{+10} \text{ m}^3$.

4.3. Estudos Isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$

De acordo com Rice (1993), acumulações de CH_4 de origem biogênica são associadas a diversos ambientes, marinhos e terrestres, e tipos de rochas, como carbonatos, rochas clásticas e carvão. Estudos das análises isotópicas dos gases podem ser utilizados para a determinação de sua origem. Grandes concentrações de CH_4 associadas a presença de outros hidrocarbonetos podem ser indicativas de possíveis fontes biogênicas (Claypool e Kaplan, 1974, Vogel et al., 1982).

Originalmente acreditava-se que o CH_4 de origem biogênica era definido exclusivamente por valores de $\delta^{13}\text{C}$ variando entre -60 e -90‰ (PDB), com produção relacionada às *Archaea* anaeróbias (Claypool e Kaplan, 1974, Nakai, 1960, Rosenfeld e Silverman, 1959, Schoell, 1980), enquanto valores de $\delta^{13}\text{C}$ maiores, entre -30 e 50 ‰ (PDB) seriam tipicamente de fontes termogênicas de gás natural (Sackett, 1978). No entanto, o CH_4 gerado a partir da redução de CO_2 e fermentação do acetato possui uma composição isotópica do carbono diferenciada (Whiticar et al., 1986), sendo a temperatura, substrato orgânico e idade fatores influentes nesses processos (Schoell, 1988).

Ainda que, no geral, o metano residual deva ser enriquecido em ^{13}C durante a biodegradação, assim como outros gases hidrocarbonetos (Whiticar, 1999), assinaturas isotópicas mais pesadas de gases de origem biogênica poderiam ser associadas, por exemplo, à oxidação anóxica do CH_4 ou à uma biodegradação de conteúdo orgânico previamente enriquecido em isótopos pesados, refletindo em uma assinatura mais pesada do que seria esperado para os gases gerados (Kotelnikova, 2002; Whiticar, 1999). Essa oxidação anóxica do metano pode ocorrer na presença de bactérias redutoras de sulfato e *Archaea* metanotróficas, as quais oxidam o CH_4 como um doador de elétrons para uso na reação de redução do sulfato (SO_4^{2-} a H_2S), conforme Madigan et al. (2016).

Outro fator de enriquecimento dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ possível seria a oxidação microbiana do metano, uma vez que frações isotópicas mais leves do carbono são preferencialmente consumidas por microorganismos (Alperin et al., 1988, Barker e Fritz, 1999, Ovsyannikov e Lebedev, 1967, Aravena e Wassenaar, 1993). Sendo assim, a composição isotópica do carbono, tanto do CH_4 quanto do CO_2 , pode ser modificada pela oxidação microbiana do CH_4 , ficando o $\delta^{13}\text{C}$ do CH_4 residual mais pesado, enquanto o do CO_2 fica mais leve (Whiticar e Faber, 1985).

A composição isotópica do CH_4 gerado a partir da redução do CO_2 é controlada principalmente pelo $\delta^{13}\text{C}$ do substrato do CO_2 original, o que relaciona assinaturas pesadas do CH_4 biogênico a redução microbiana de CO_2 isotopicamente pesado (Kotelnikova, 2002). Há ainda a

possibilidade de mistura de gases de origens distintas, como CH₄ de origens biogênicas e gases derivados de processos abiogênicos, como o craqueamento termal do petróleo, o que poderia alterar a assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ (Kotelnikova, 2002). De acordo com Milkov (2011), acumulações de gases com CO₂ enriquecido em ¹²C teriam maior contribuição de metano termogênico, e podem representar a geração inicial de CO₂ pela biodegradação de petróleo ainda não convertido em metano (Feisthauer et al., 2010).

Em resumo, gases de origem microbial secundária, gerados pela biodegradação de petróleo, teriam assinaturas $\delta^{13}\text{C}$ variadas para CH₄ e CO₂, dependendo da composição inicial do petróleo, condições do meio, tipo de microorganismos atuantes, nível da biodegradação e volume de CO₂ convertido em CH₄ (Milkov, 2011). Ainda, considerando-se que sistemas petrolíferos são, na maioria, sistemas semi-abertos, a maioria dos gases em subsuperfície representam misturas de moléculas de diferentes fontes e origens (Milkov, 2011).

Estudos realizados por Loufí et al. (2011) em extrato orgânico obtido a partir de folhelhos geradores da Formação Irati, com altos teores de COT, indicam valores de $\delta^{13}\text{C}$ do conteúdo orgânico entre -22,6 e -23,0‰ PDB, o que já seria um conteúdo relativamente enriquecido em isótopos pesados. Deve-se ter em mente que esse conteúdo orgânico seria associado à geração do petróleo acumulado nos arenitos asfálticos da Formação Pirambóia (Thomaz Filho, 1982), cuja biodegradação é aqui estudada.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Para alcançar os objetivos propostos no presente trabalho, experimentos de incubação em amostras da Formação Piramboia foram desenvolvidas sob diferentes condições, em ambiente controlado, conservados sob temperatura ambiente (22°C) fora do alcance da luz solar.

5.1. Amostragem

Foi realizado trabalho de campo em duas localidades específicas (Figura 1), para coleta de amostras a serem utilizadas neste estudo:

a) Fazenda Betumita, 14 km a noroeste de Anhembi, SP, coordenadas UTM 835744E / 7510757N. O acesso à área pode ser feito através da Rodovia SP-147, sentido município de Anhembi e utilizando uma estrada de terra a cerca de 40 km da cidade, a qual segue para a Fazenda;

b) Morro do Bofete, na beira da Rodovia Castelo Branco, SP-280, km 173,5 sentido interior, coordenadas UTM 783254E / 7432376N, próximo à cidade de Bofete (SP).

Na amostragem, foram feitas coletas de material *in situ*, tanto de amostras sólidas quanto de amostras gasosas (Figuras 2 e 3). Foram coletadas três amostras impregnadas de arenito na Fazenda Betumita e duas no Morro do Bofete, totalizando cinco amostras de material impregnado da mesma formação, devidamente identificadas e armazenadas.

Para a coleta de amostras gasosas *in situ* foram utilizadas 5 câmaras de cloreto de polivinil (PVC), espaçadas em aproximadamente 10m uma da outra em linha reta, sobre solo (Figura 3). Todas foram fechadas e isoladas ao mesmo tempo, realizando-se coletas no momento de fechamento, 10, 20 e 30 minutos depois (Hutchinson e Livingston, 1993), em *vials* de vidro de 20ml, previamente evacuados e selados com rolhas de borracha (Khalil et al., 2004). Com isso, buscou-se avaliar a variação das concentrações no interior das câmaras ao longo do tempo para, então, proceder com o cálculo de fluxos gasosos, conforme Davidson et al. (2002).

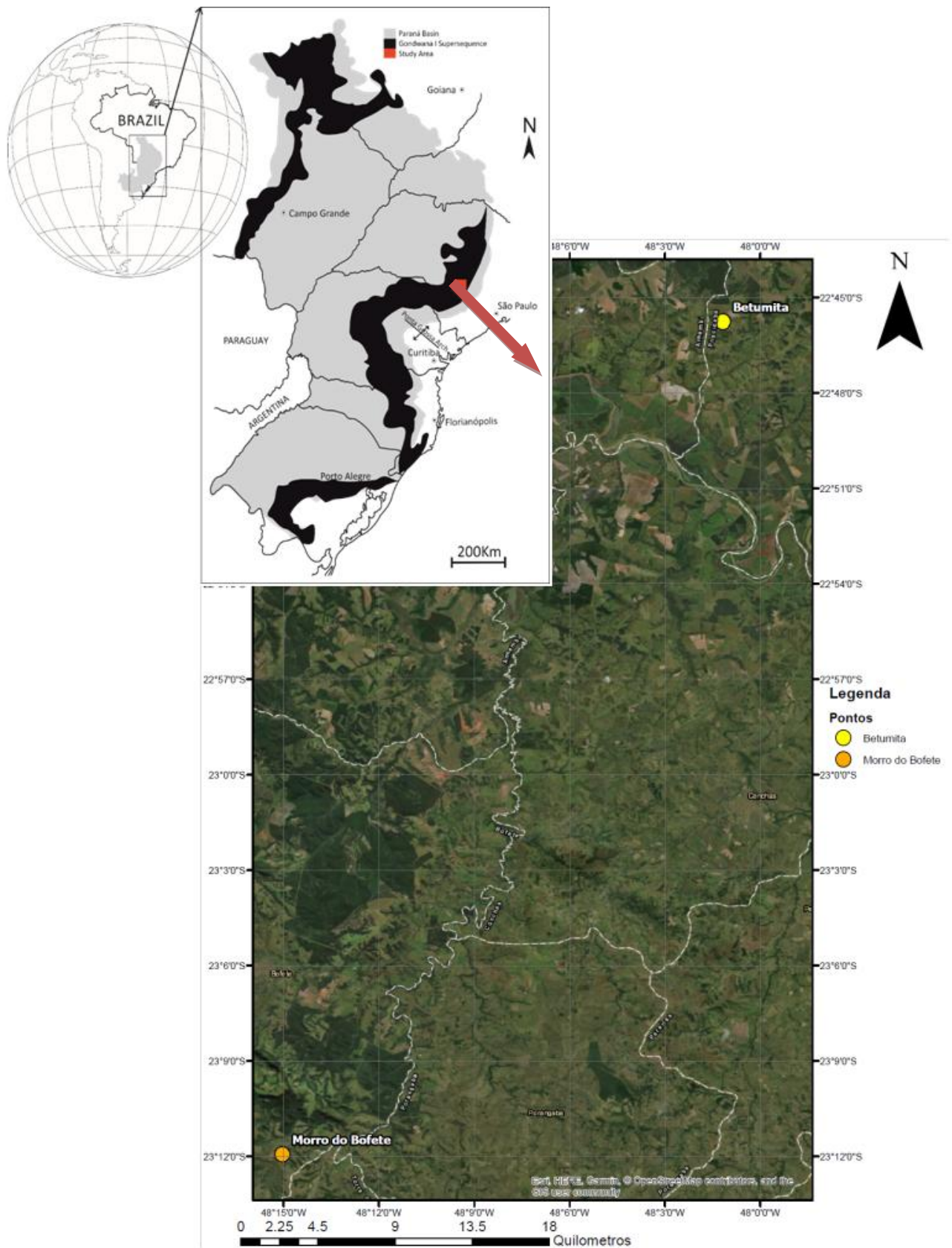


Figura 1: Mapa de localização dos Pontos de coleta de Amostras Fazenda Betumita em amarelo e Morro do Bofete em laranja). Modificado de Teixeira et al. (2018).



Figura 2: Afloramento da Formação Pirambóia na Fazenda Betumita. É possível observar a fácies interduna (clara) e fácies duna (escura) impregnada com hidrocarbonetos. (Fonte: o autor).

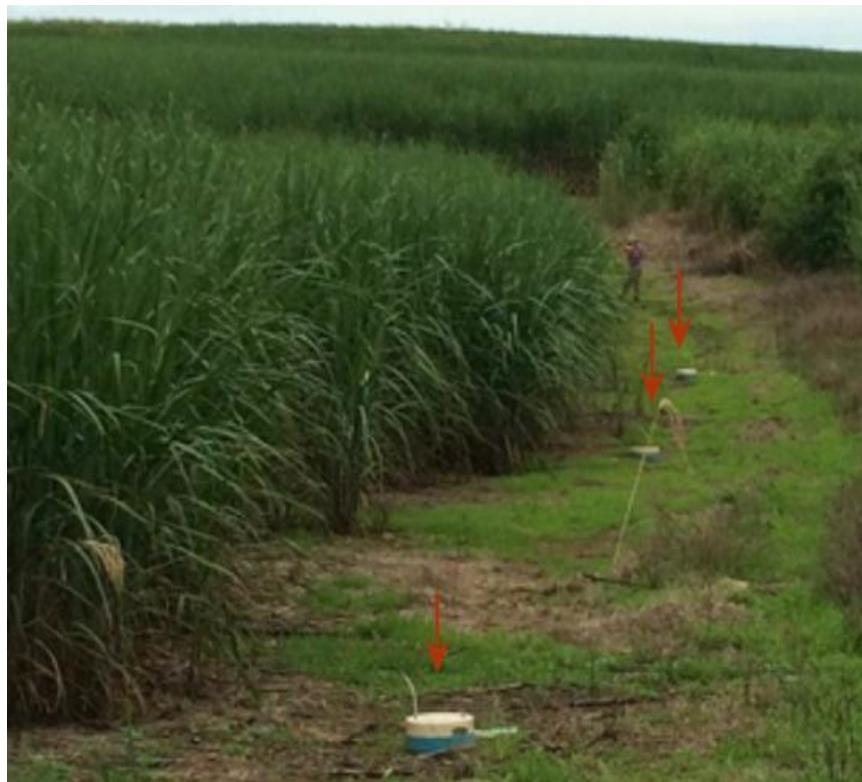


Figura 3 : Coleta de gases com câmara nas proximidades da Fazenda Betumita. (Fonte: o autor).

5.2. Preparação dos experimentos de incubação para produção de CH₄ e CO₂

Foram realizados dois experimentos distintos, um para análise da influência da presença de água (a) e outro para a análise da influência da concentração de sulfato (b).

A preparação do material para incubação foi feita a partir da desagregação das amostras coletadas no Laboratório de Tratamento de Amostras (LTA) do Instituto de Geociências, a partir de almofariz e moinho de ágata hidráulico. No mesmo local foi feita a moagem de amostra de gipsita pura (sulfato de cálcio di-hidratado), para obtenção de sulfato em pó para adição no experimento.

Posteriormente, esse material foi peneirado a seco, em agitador de peneiras mecânico, recolhendo-se o material passante na malha de 0,063mm, no Laboratório de Sedimentologia (LabSed) do Instituto de Geociências, de forma a se obter uma granulação fina e o mais homogênea possível (Figura 4). Alíquotas desse material final foram investigadas por Análise Granulométrica por Difração a Laser, com o uso do equipamento Malvern, do mesmo laboratório, buscando-se a conferência de sua homogeneidade granulométrica de modo a se evitar interferências de possíveis variações granulométricas nos resultados dos experimentos.

Para o primeiro experimento (a), foram realizadas incubações para as três amostras da Fazenda Betumita (MPA, MPB e MPC), sob condições naturais seca e úmida, em triplicatas para cada condição, totalizando seis incubações para cada amostra e dezoito incubações no total.

A preparação das incubações consistiu da adição de 15g de arenito asfáltico desintegrado em *vial* de vidro transparente de 100ml, seguida pela adição de 20ml de água deionizada para os experimentos sob condições úmidas (Dannenberg et al., 1997). Após isso, os *vials* foram selados, lacrados, evacuados e preenchidos com nitrogênio 5.0 (de alta pureza 99,999%), para a simulação de condições anóxicas, favoráveis ao desenvolvimento de microorganismos anaeróbicos (Figura 5).

Para o segundo experimento (b), determinou-se a realização de incubações para análise de influência no meio de 4 concentrações de sulfato distintas, em triplicatas para cada concentração, totalizando 12 incubações por amostra e sendo utilizadas duas amostras da Fazenda Betumita (MPB e MPC) e duas do Morro do Bofete (Bof e IP-03-R2) para a análise, totalizando quarenta e oito incubações preparadas no total. As concentrações de sulfato utilizadas foram definidas a partir de valores naturais de teor de sulfato encontrados principalmente sob forma de cimento em amostras diversas de arenitos (Okada, 1971), 0%, 0,5%, 2% e 5% de massa de sulfato em relação ao valor da massa total da amostra incubada. As incubações para avaliação da influência de sulfato foram realizados sob condições úmidas, buscando-se uma aproximação das condições naturais, nas quais geralmente, em baixas profundidades e abaixo do nível freático, as formações encontram-se suscetíveis à infiltração de águas, sejam subterrâneas ou meteóricas.

A rotina para o desenvolvimento do segundo experimento englobou a preparação das incubações com adição de 15g de arenito asfáltico desintegrado por *vial* de vidro transparente de 100ml, seguida da adição de gipsita e por 20ml de água deionizada em todos os recipientes. Após isso, os *vials* foram selados, lacrados, evacuados e preenchidos com atmosfera de nitrogênio da mesma forma que no primeiro experimento.



Figura 4. Peneiras utilizadas para seleção e homogeneização granulométrica da gipsita moída, para preparação dos experimentos.



Figura 5. Processo de evacuação e inserção de N_2 nos *vials* já preenchidos com o conteúdo para análise.

5.3. Determinação da concentração de CH_4 e CO_2 por cromatografia gasosa

As amostras de gás coletadas em campo com câmaras foram submetidas à uma análise de cromatografia gasosa cada, de forma a avaliar a concentração de CH_4 e CO_2 para cálculo de emissões atmosféricas na área de estudo da bacia.

Por outro lado, as análises por cromatografia das concentrações do CH_4 e CO_2 nos *vials* dos experimentos foi feita a partir da injeção de 4ml de N_2 nos recipientes (nas mesmas especificações já mencionadas) e retirada do mesmo volume para a análise, de forma a manter as condições do ambiente interno constantes. Essas amostragens são realizadas em períodos de tempo previamente definidos (Tabela 1), de forma a se acompanhar a evolução das produções gasosas. Assim, a primeira medição (T_0) foi feita no momento de fechamento das incubações e as medições seguintes são feitas a partir de intervalos de tempo crescentes. O experimento (a) foi conduzido ao longo de aproximadamente um ano, com acompanhamento contínuo das produções. Já o experimento (b) teve uma duração de cerca de 45 dias, também com medições contínuas.

O método utilizado para medições foi a cromatografia gasosa por ionização de chama a partir do cromatógrafo Thermo-Scientific Trace 1310, no Laboratório de Espectrometria Gama e Luminescência (LEGaL) do Instituto de Geociências da USP.

Tabela 1. Medidas e número de dias corridos a partir do início dos experimentos.

Medida	Água	Sulfato
	(dias)	(dias)
T0	0	0
T1	1	2
T2	3	5
T3	7	14
T4	13	21
T5	19	43
T6	25	
T7	30	
T8	91	
T9	131	
T10	202	
T11	295	
T12	363	

5.4. Medições de pH

Foram realizadas medições de pH do meio aquoso dos experimentos no início e ao término dos mesmos, buscando avaliar sua influência. Na preparação das incubações, foi medido o pH do meio aquoso das incubações antes do fechamento dos *vials* e ao fim dos experimentos, logo após a abertura dos *vials*, a partir da utilização de indicadores ácido-base, conforme Figura 6.



Figura 6: Medição de pH do meio aquoso interno a partir de indicador ácido base, ao término do experimento. (Fonte: o autor).

5.5. Análises Isotópicas

A caracterização isotópica e definição do $\delta^{13}\text{C}$ do carbono do CH_4 e CO_2 coletados a partir dos experimentos foi realizada pelo Laboratório de Isótopos Estáveis da UC Davis - Califórnia, a partir de espectrômetro de massa de razão isotópica (ThermoScientific Delta V Plus - EA-IRMS) acoplado a um concentrador de gás automático (Thermo-Scientific PreCon). Os resultados finais de $\delta^{13}\text{C}$ foram apresentados em relação ao padrão internacional ‰ V-PDB (Vienna PeeDee Belemnite).

O valor $\delta^{13}\text{C}$ do carbono é definido conforme Craig (1953), no qual $R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ e R (PDB) Pee Dee Belemnite standard = 0.0112372:

$$\delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{pdb}}) - 1] \times 1000.$$

Os gases utilizados nas análises foram extraídos de 2 amostras de *vials* dos experimentos para análise da influência de água (MPB_hum e MPC_hum). Foram retirados 15ml da atmosfera dos *vials* ao fim do experimento e transferidos para *vials* do tipo Exetainers (brand Labco), de 12ml, previamente evacuados, os quais foram enviados para as análises.

Das análises de dados e interpretações, foram levados em conta indicadores isotópicos definidos por Milkov (2007) da seguinte forma: taxas de $\delta^{13}\text{C}$ de $\text{CH}_4 < -55$ ‰ PDB são relacionadas à origem biogênica do mesmo, enquanto que se $\delta^{13}\text{C}$ de $\text{CH}_4 > -55$ ‰ PDB, a gênese é inferida como termogênica. Valores entre -55 ‰ e -35 ‰ são questionáveis, sendo requeridos dados de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 , de forma que se $>+2$ ‰ a origem é associada à processos de biodegradação do material.

6. RESULTADOS OBTIDOS

6.1. Análise Granulométrica Por Difração a Laser

Foram realizadas análises em 6 alíquotas do conteúdo de sulfato obtido após moagem e peneiração. De acordo com os resultados das análises de granulometria do conteúdo de sulfato utilizado nas incubações, a partir da técnica de Difração a Laser, pode-se determinar uma predominância das frações silte médio a grosso (Wentworth, 1922), somando cerca de 60% do conteúdo analisado (Tabela 2) e indicando um grau de homogeneidade satisfatório do material utilizado no experimento.

Tabela 2. Resultados de Análise Granulométrica por Difração a Laser do conteúdo de sulfato, com valores indicando a porcentagem da respectiva faixa na alíquota.

Amostra	Faixa Granulométrica (%)									
	Areia					Silte				Argila
	Muito Grossa	Grossa	Média	Fina	Muito Fina	Grosso	Médio	Fino	Muito Fino	
	0,25	0,75	1,75	2,75	3,75	4,5	5,5	6,5	7,5	9
1	0	0	0	0,12	17,823	38,03	26,745	9,52	3,146	4,617
2	0	0	0	0	11,086	32,576	28,974	14,987	5,724	6,653
3	0	0,04	0,443	0,456	15,207	37,199	27,705	10,355	3,37	5,225
4	0	0	0	0,446	15,076	36,445	27,502	11,025	3,937	5,569
5	0	0	0	0,466	15,54	37,507	27,249	10,218	3,761	5,259
6	0	0	0	0,493	12,821	31,848	26,814	14,084	6,478	7,462

6.2. Análise de pH

Foram realizadas medições do pH no início dos experimentos (4,5), e ao término dos experimentos, no meio aquoso do interior dos *vials*, conforme resultados a seguir, apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Para o experimento de avaliação da influência da água, que durou aproximadamente 1 ano, a partir das medições de pH ao término dos experimentos, em comparação com o pH inicial da água (4,5), pode-se observar que esse parâmetro sofreu pouca ou nenhuma variação, mantendo sua acidez constante, com pH final variando em torno de 4 a 5 (Tabela 3).

Tabela 3: Medida de pH do meio aquoso interno ao término dos experimentos.

Amostra	pH
MPA_1	4,5
MPA_2	4
MPA_3	4
MPB_1	5
MPB_2	5
MPB_3	5
MPC_1	5
MPC_2	5
MPC_3	5

Para o segundo experimento de avaliação da influência do sulfato no processo, a partir das medições de pH ao término dos experimentos, em comparação com o pH inicial da água (4,5), pode-se observar que esse parâmetro também não sofreu variação significativa, mantendo sua acidez constante, com pH final variando em torno de 4,5 a 5 para as incubações de todas as amostras analisadas (Tabela 4).

Tabela 4: Medida de pH do meio aquoso interno ao término dos experimentos.

Amostra	Teor de sulfato (%)	pH	Amostra	Teor de sulfato (%)	pH	Amostra	Teor de sulfato (%)	pH	Amostra	Teor de sulfato (%)	pH
BOF 1	0	4,5	IP-03-R2 1	0	4,5	MPC 1	0	5	MPB 1	0	5
BOF 2	0	4,5	IP-03-R2 2	0	4,5	MPC 2	0	5	MPB 2	0	5
BOF 3	0	4,5	IP-03-R2 3	0	5	MPC 3	0	5	MPB 3	0	5
BOF 1	0,5	5	IP-03-R2 1	0,5	5	MPC 1	0,5	5	MPB 1	0,5	5
BOF 2	0,5	4,5	IP-03-R2 2	0,5	4,5	MPC 2	0,5	5	MPB 2	0,5	5
BOF 3	0,5	4,5	IP-03-R2 3	0,5	5	MPC 3	0,5	5	MPB 3	0,5	4,5
BOF 1	2	5	IP-03-R2 1	2	5	MPC 1	2	5	MPB 1	2	4,5
BOF 2	2	4,5	IP-03-R2 2	2	5	MPC 2	2	5	MPB 2	2	5
BOF 3	2	4,5	IP-03-R2 3	2	4,5	MPC 3	2	5	MPB 3	2	5
BOF 1	5	4,5	IP-03-R2 1	5	5	MPC 1	5	5	MPB 1	5	5
BOF 2	5	4,5	IP-03-R2 2	5	4,5	MPC 2	5	5	MPB 2	5	4,5
BOF 3	5	4,5	IP-03-R2 3	5	4,5	MPC 3	5	5	MPB 3	5	5

6.3. Resultados da Cromatografia Gasosa

A partir das análises de cromatografia gasosa realizadas nas amostras de gás coletadas *in situ* e na atmosfera dos *vials* ao longo dos experimentos, foram obtidos os seguintes resultados, aqui apresentados sob forma de gráficos para cada experimento.

6.3.1. Avaliação da emissão natural de gases *in situ*

Resultados de cromatografia gasosa realizada a partir das amostras de gás coletadas em campo indicaram que não há fluxo de CO₂ e CH₄ a partir do solo para a atmosfera.

6.3.2. Avaliação da influência da presença de água na geração de CH₄

A partir dos resultados das concentrações de CH₄ e CO₂, obtidos pela cromatografia gasosa, e da elaboração de gráficos, pode-se concluir que a presença de água parece influir diretamente nas taxas de produção potencial dos gases, principalmente no período inicial, quando as concentrações de metano nas incubações úmidas são maiores que nas secas (Figuras 7 a 9). Pode-se observar ainda que houve um progressivo aumento das concentrações ao longo do tempo, indicando que a geração de gases foi mantida no decorrer do experimento.

No entanto, foram notados diferentes comportamentos para as diferentes amostras após o primeiro mês do experimento. Para as amostras MPA (Figura 7A) e MPB (Figura 7B) essa tendência se inverte a partir do primeiro e do quinto mês, respectivamente (aproximadamente 40 e 150 dias), quando, então, amostras sob condição seca passam a ter concentrações maiores de metano. Já para a amostra MPC (Figura 7C), as maiores concentrações de CH₄ obtidas foram sempre associadas à presença de água.

Em relação à produção, considerando-se as taxas de geração obtidas ao final dos experimentos, tem-se uma média anual de geração de aproximadamente 18 ml de CH₄ por tonelada de material biodegradado, sob condições úmidas, e de aproximadamente 25 ml/ton de CH₄ para condições secas.

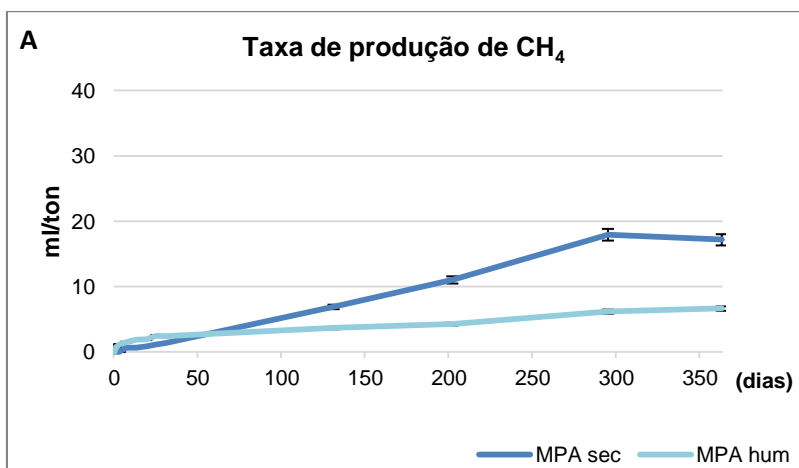


Figura 7A: Taxa de produção de CH₄ (ml/ton) ao longo do tempo de experimento (dias) para a amostra MPA sob condições seca e úmida.

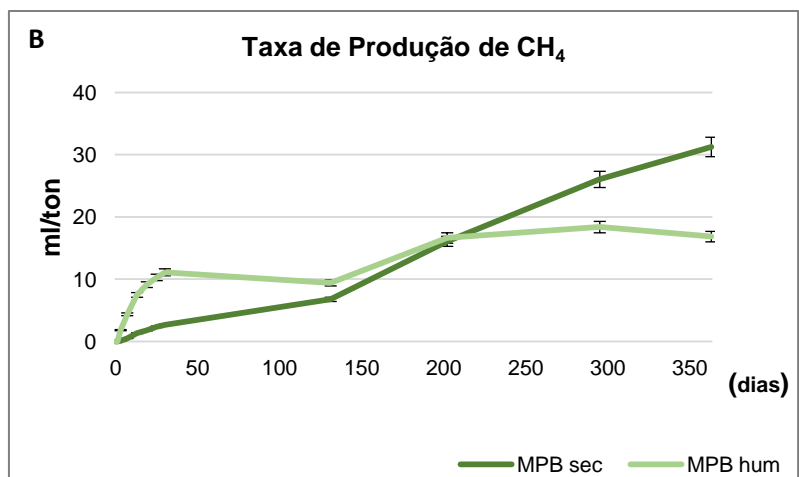


Figura 7B: Taxa de produção de CH₄ (ml/ton) ao longo do tempo de experimento (dias) para a amostra MPB sob condições seca e úmida.

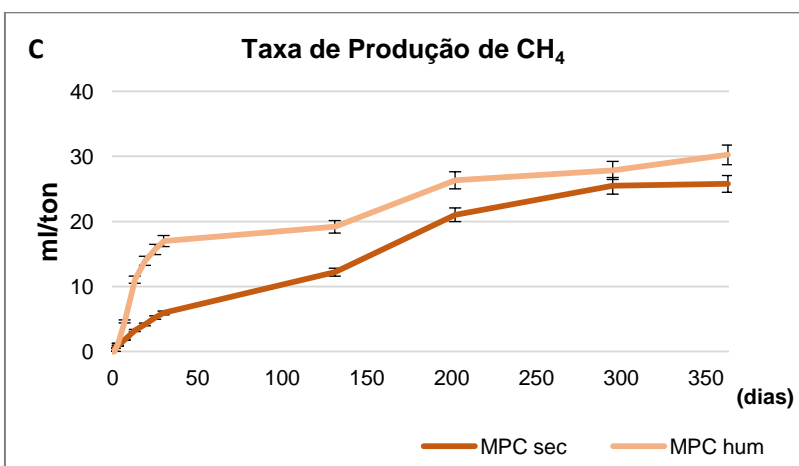


Figura 7C: Taxa de produção de CH₄ (ml/ton) ao longo do tempo de experimento (dias) para a amostra MPC sob condições seca e úmida.

6.3.3. Avaliação da influência da presença de água na geração de CO₂

A água mostrou-se como um fator condicionante fundamental na geração de CO₂ no experimento, visto que as concentrações nas amostras mantidas sob condições úmidas superaram em até 4 escalas de grandeza as concentrações de amostras mantidas sob condições secas (Figuras 8A, 8B e 8C). Houve um crescimento gradual geral das concentrações em todos os casos analisados, confirmando uma continuidade da geração de gases, já observada na avaliação da geração de CH₄.

Para todos os experimentos, a produção de CO₂ na ausência de água teve um crescimento gradual, com média anual de aproximadamente 1500 ml de CO₂ por tonelada de material biodegradado para condições secas e 1900 ml/ton de CO₂ para condições na presença de água.

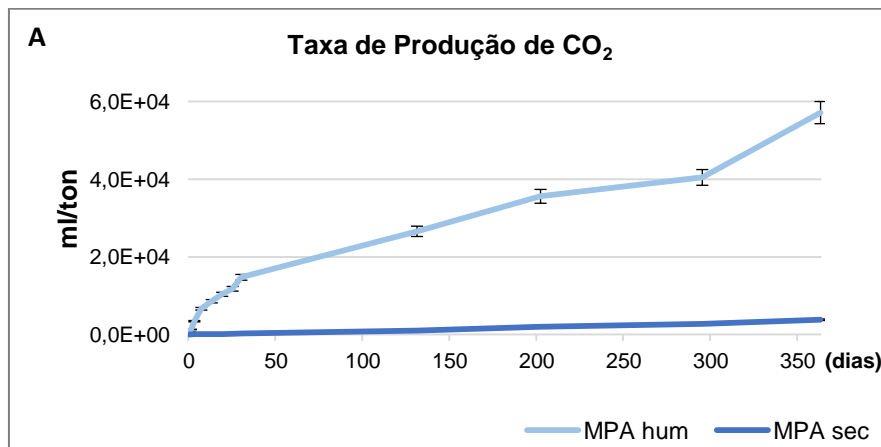


Figura 8A: Taxa de produção de CO₂ (ml/ton) ao longo do tempo de experimento (dias) para a amostra MPA sob condições seca e úmida.

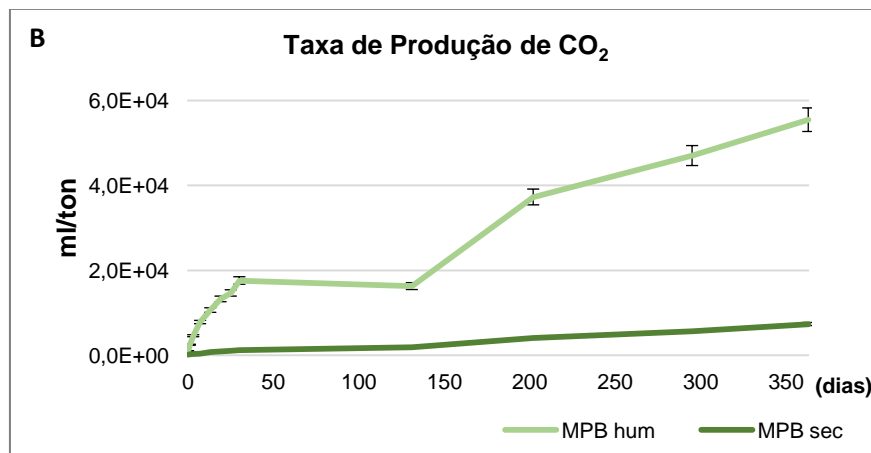


Figura 8B: Taxa de produção de CO₂ (ml/ton) ao longo do tempo de experimento (dias) para a amostra MPB sob condições seca e úmida

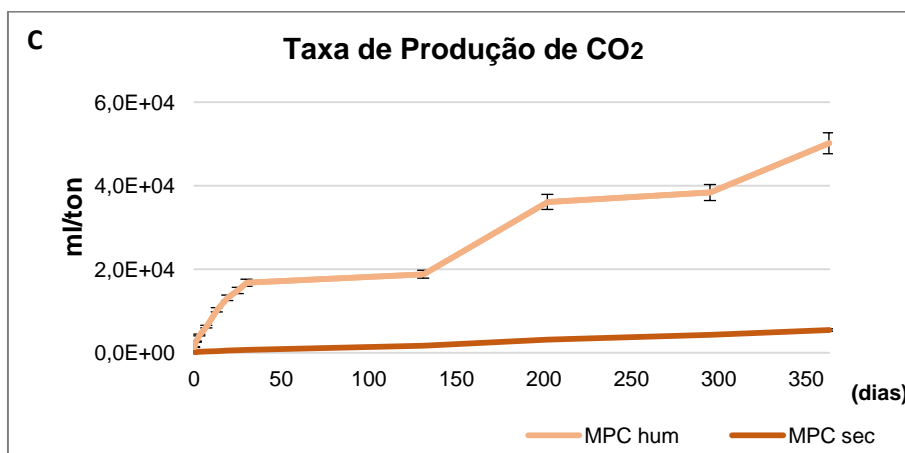


Figura 8C: Taxa de produção de CO₂ (ml/ton) ao longo do tempo de experimento (dias) para a amostra MPC sob condições seca e úmida

6.3.4. Avaliação das concentrações de sulfato na geração de CH₄

De acordo com os resultados dos experimentos de incubação com diferentes teores de sulfato (0%, 0,5%, 2%, 5% em massa), foram elaborados gráficos para concentrações de CH₄ e CO₂ obtidas.

Observando as Figuras 9A, 9B, 9C, 9D, nas quais são relacionadas as taxas de produção de metano ao longo do tempo, para diferentes concentrações de sulfato utilizadas para as incubações (0%, 0,5%, 2% e 5%), é possível observar uma tendência geral de crescimento na produção para todos os experimentos e amostras, o que indica que o sulfato, para as dadas concentrações, não seria um fator inibidor da produção. Além disso, nota-se uma variação muito pequena dessa produção para diferentes teores de sulfato utilizados, sendo que para duas amostras (Bof e MPC) houve maior produção em incubações com 5% de sulfato em massa, enquanto que para as outras duas amostras (IP-03-R2 e MPB) ocorreu o contrário, com menores produções para esse mesmo teor. O gráfico da Figura 10 foi elaborado de forma a se buscar um esclarecimento sobre a influência de diferentes teores de sulfato na produção biogênica de gases.

A partir dos dados obtidos nesses experimentos, pode-se estimar uma média anual de produção de aproximadamente 110 ml/ton de CH₄ para concentrações estudadas, partir de uma tonelada de material biodegradado.

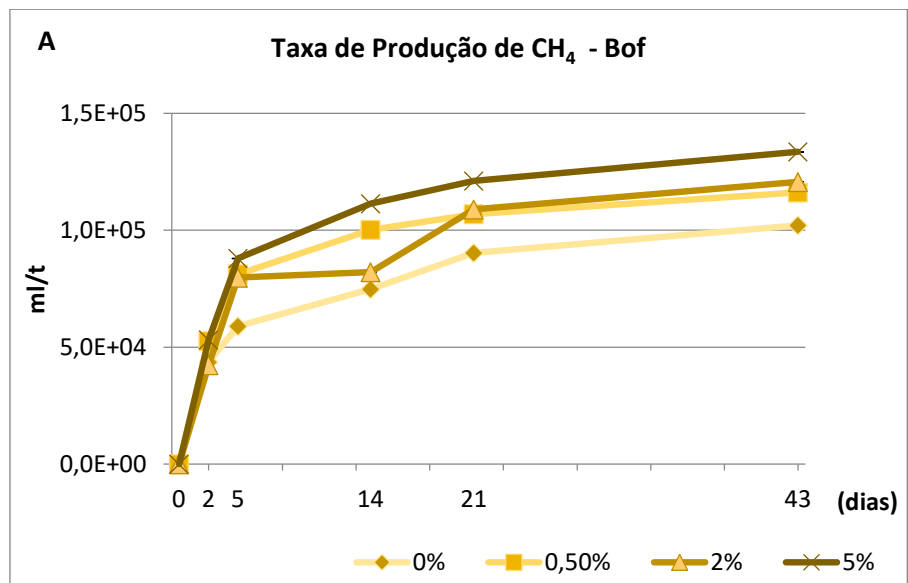


Figura 19A: Comparação das taxas de produção de CH₄ (ml/ton) vs Tempo (dias) de cada teor de sulfato utilizado para as diferentes amostras estudadas.

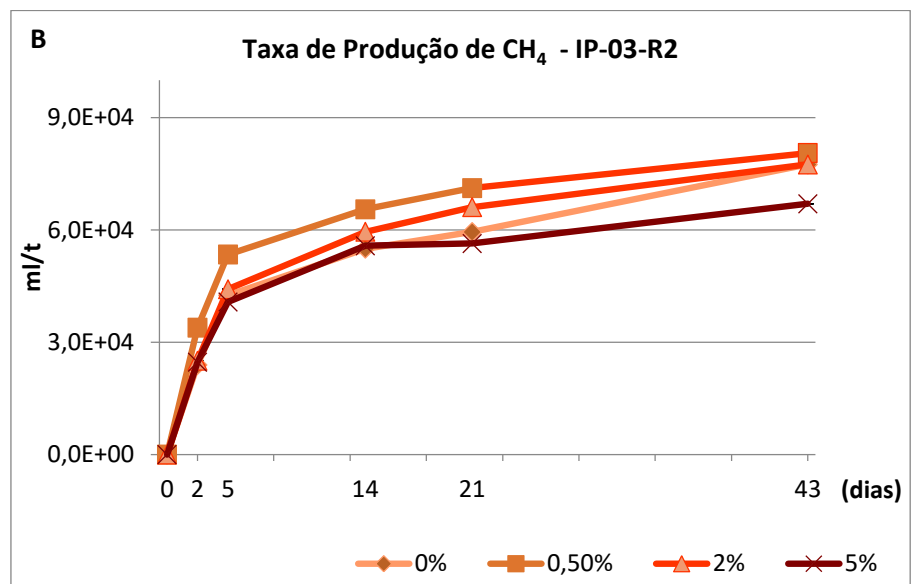


Figura 9B: Comparação das taxas de produção de CH₄ (ml/ton) vs Tempo (dias) de cada teor de sulfato utilizado para as diferentes amostras estudadas.

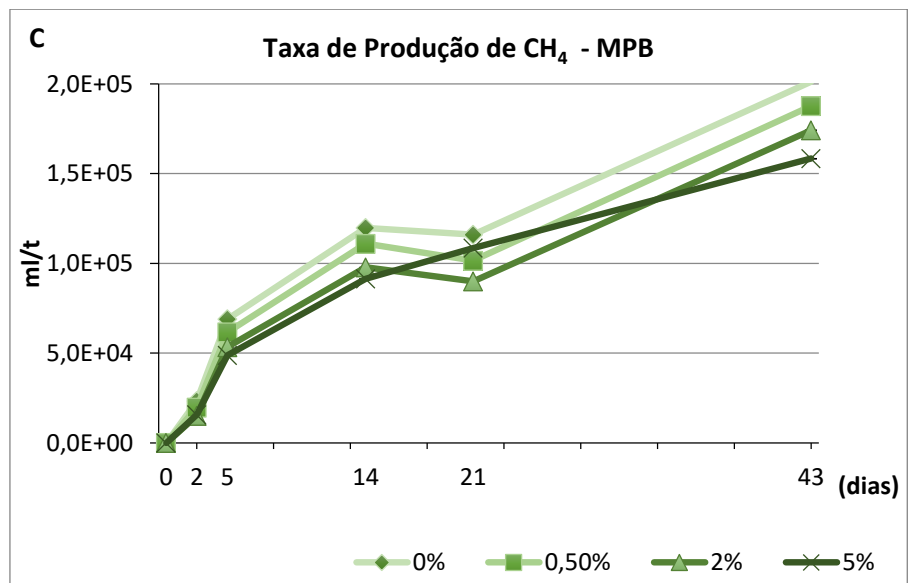


Figura 9C: Comparação das taxas de produção de CH₄ (ml/ton) vs Tempo (dias) de cada teor de sulfato utilizado para as diferentes amostras estudadas.

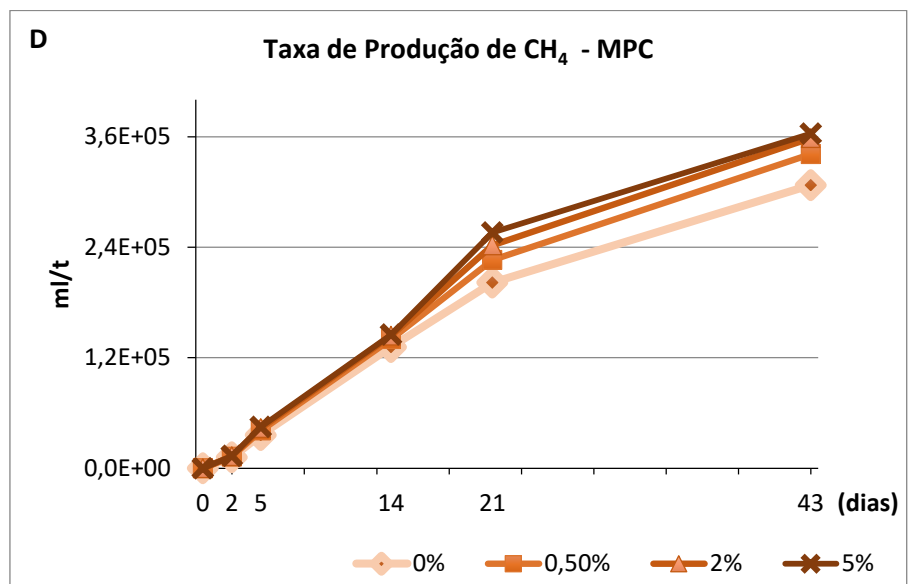


Figura 9D: Comparação das taxas de produção de CH₄ (ml/ton) vs Tempo (dias) de cada teor de sulfato utilizado para as diferentes amostras estudadas.

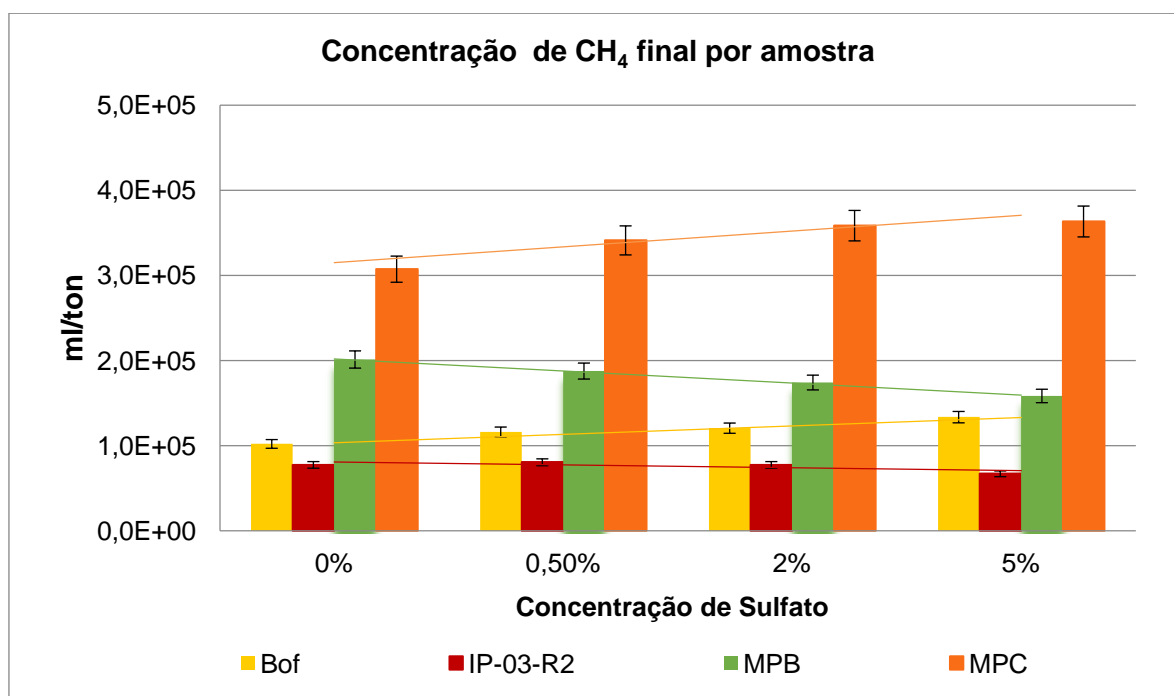


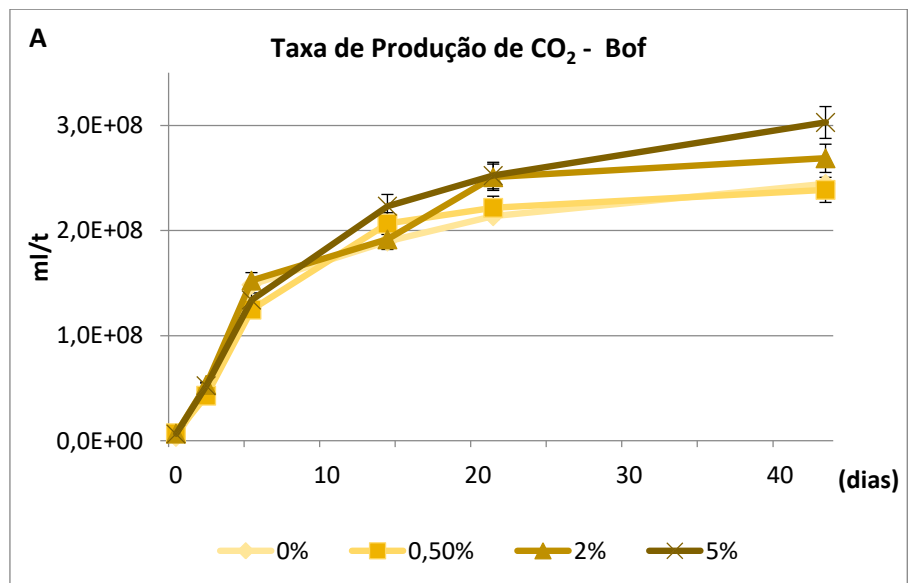
Figura 10: Concentrações máximas de CH₄ (ml/ton) obtidas para cada amostra, de acordo com o teor de sulfato utilizado na preparação das incubações.

6.3.5. Avaliação das concentrações de sulfato na geração de CO₂

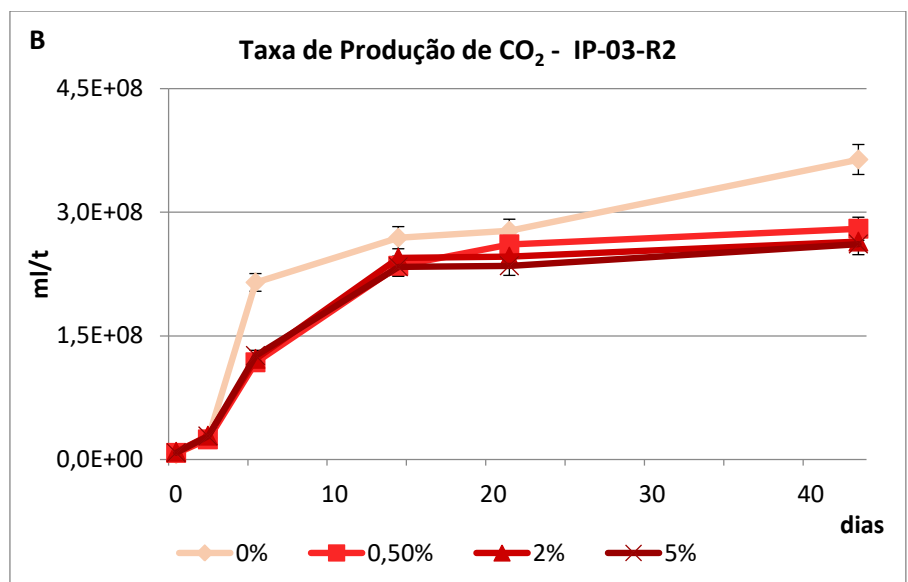
A partir da observação dos gráficos gerados para avaliação das concentrações de CO₂ obtidas ao longo do tempo (Figuras 11A, 11B, 11C e 11D), pode-se notar uma evolução crescente gradual nas concentrações de CO₂, o que indica que a presença do sulfato também não atua inibindo esse processo gerador.

Novamente pode-se notar a inexistência de um padrão de influência que relacione os diferentes teores de sulfato analisados (0%, 0,5%, 2% e 5%) com as taxas de produção de CO₂ nos experimentos (Figura 12), confirmando a independência das concentrações de sulfato na geração de gases nas dadas condições, para arenitos asfálticos.

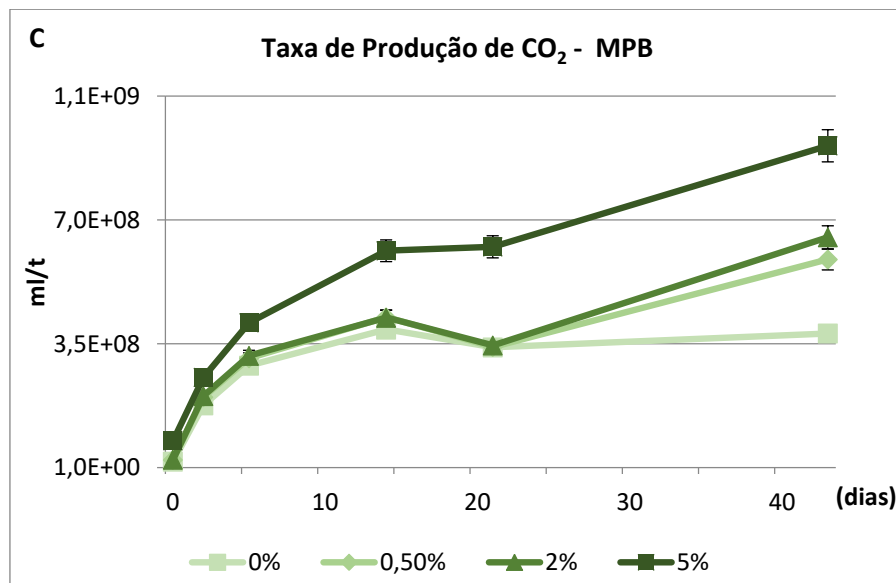
A partir dos dados, pode-se estimar uma produção média, a partir da biodegradação de 1 tonelada de material, de aproximadamente 2,2 E⁵ ml de CO₂ na ausência de sulfato (0%), 2,5 E⁵ litros para concentrações de 0,5% e 2% e de cerca de 2,8 E⁵ ml de CO₂ na presença de teores de 5% de sulfato em massa. Tais médias e suas pequenas variações confirmam que o sulfato também não seria um fator de influência determinante nos experimentos.



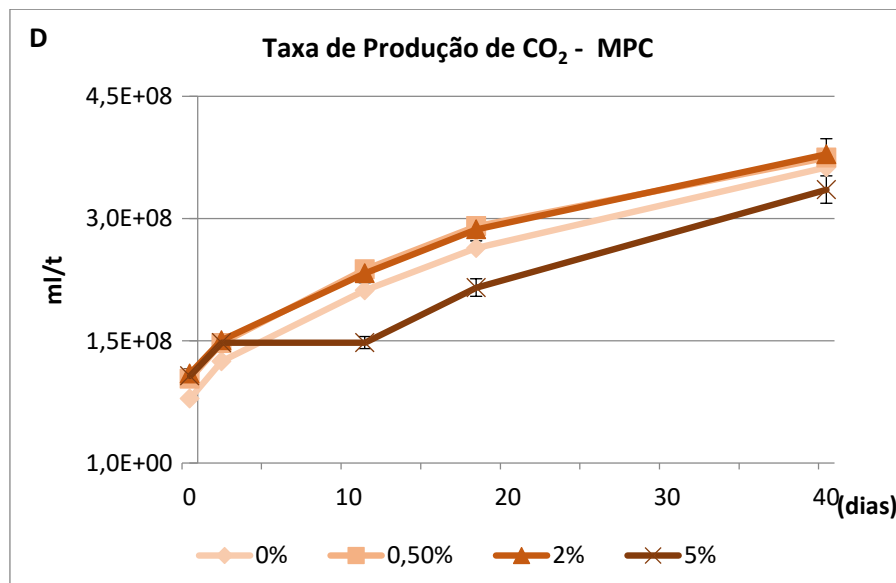
Figuras 11A: Comparação das taxas de produção de CO₂ (ml/ton) vs Tempo (dias) de cada teor de sulfato utilizado para as diferentes amostras estudadas.



Figuras 11B: Comparação das taxas de produção de CO₂ (ml/ton) vs Tempo (dias) de cada teor de sulfato utilizado para as diferentes amostras estudadas.



Figuras 11C: Comparação das taxas de produção de CO₂ (ml/ton) vs Tempo (dias) de cada teor de sulfato utilizado para as diferentes amostras estudadas.



Figuras 11D: Comparação das taxas de produção de CO₂ (ml/ton) vs Tempo (dias) de cada teor de sulfato utilizado para as diferentes amostras estudadas.

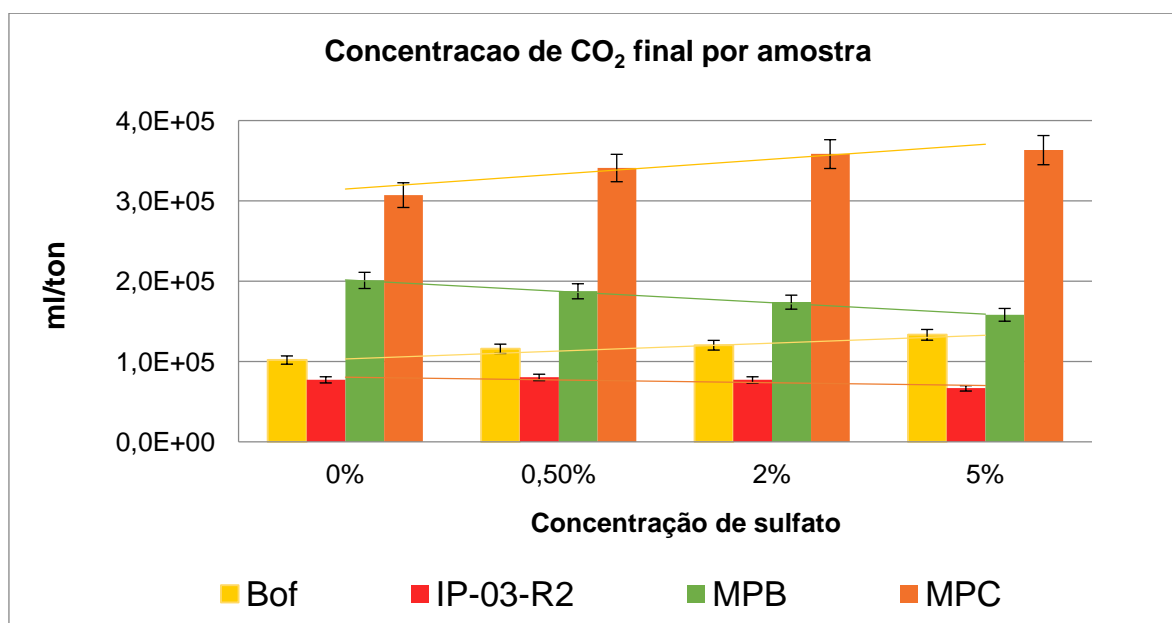


Figura 12: Concentrações máximas de CO₂ (ml/ton) obtidas para cada amostra, de acordo com o teor de sulfato utilizado na preparação das incubações.

6.4 Análise de correlação e coeficiente de correlação de Pearson para CH₄ e CO₂

Foram elaborados gráficos de dispersão, com correspondentes linhas de tendência e R², para avaliar o grau de correlação entre a geração de CH₄ e CO₂, a partir dos resultados obtidos nos experimentos, bem como seu comportamento em relação à mediana. Também foi realizado o cálculo dos Coeficientes de Pearson (r) para cada amostra estudada (Tabela 5), de forma a compreender a dependência entre as duas matrizes.

6.4.1. Experimento para avaliação da influência da água

Para o primeiro experimento, foram gerados gráficos de correlação entre as produções de CH₄ e CO₂ para as amostras, em condições secas (Figura 13) e úmidas (Figura 14). Os valores de R², são maiores que 0,6, no geral, para ambas as condições seca e úmida. Os coeficientes de correlação de Pearson calculados (Tabela 5) para a geração dos gases variaram entre 0,78 e 0,98.

Tabela 5 : Coeficientes de correlação de Pearson (r) obtidos para as amostras analisadas, ao término do experimento.

Amostra	r
MPA sec	0,887788
MPA hum	0,779673
MPB sec	0,986987
MPB hum	0,877651
MPC sec	0,946981
MPC hum	0,941948

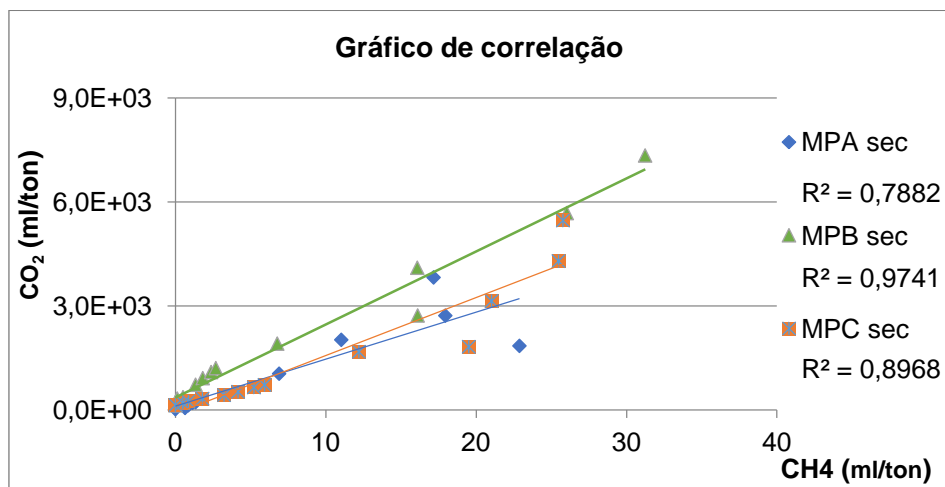


Figura 13: Gráfico de dispersão e linhas de tendência entre as concentrações obtidas de CH₄ e CO₂ ao longo dos experimentos para as amostras analisadas sob condições secas.

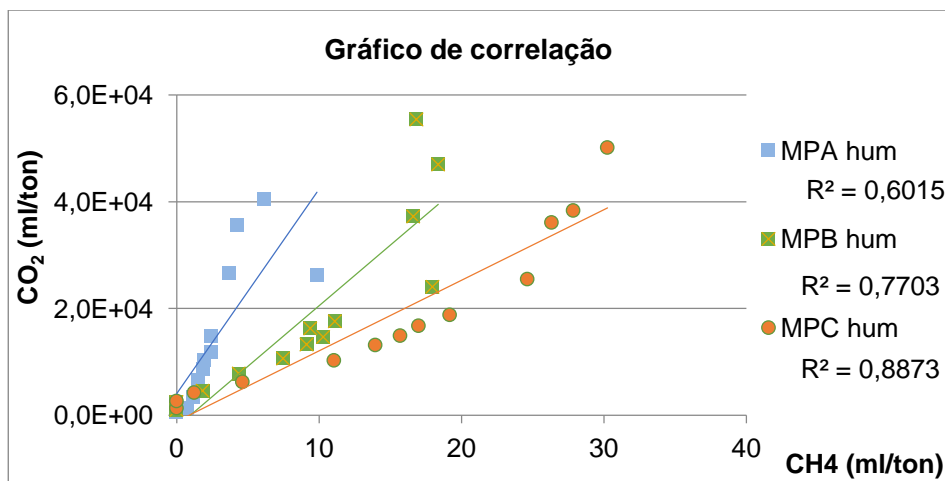


Figura 14: Gráfico de dispersão e linhas de tendência entre as concentrações obtidas de CH₄ e CO₂ ao longo dos experimentos para as amostras analisadas sob condições úmidas.

6.4.2. Experimento para avaliação da influência do sulfato

Para o caso dos experimentos desenvolvidos sob diferentes condições de sulfato, os coeficientes de correlação de Pearson calculados (Tabela 6) para a geração dos gases (CH₄ e CO₂) foram, no geral, maiores do que 0,87, indicando que o CO₂ seja possivelmente um subproduto ou associado à geração do CH₄.

Em relação aos gráficos, conforme Figuras 15A, 15B, 15C e 15D, pode-se definir uma dependência e alta correlação entre essa produção de gases, uma vez que os valores de R² são maiores que 0,79, no geral.

Tabela 6: Coeficientes de Pearson (r) obtidos para as amostras analisadas, ao término do experimento:

Amostra	Teor	r
BOF	0%	0,967
	0,50%	0,953
	2%	0,981
	5,00%	0,963
IP-03-R2	0%	0,967
	0,50%	0,927
	2%	0,958
	5,00%	0,958
MPB	0%	0,871
	0,50%	0,967
	2%	0,971
	5,00%	0,889
MPC	0%	0,980
	0,50%	0,963
	2%	0,965
	5,00%	0,953

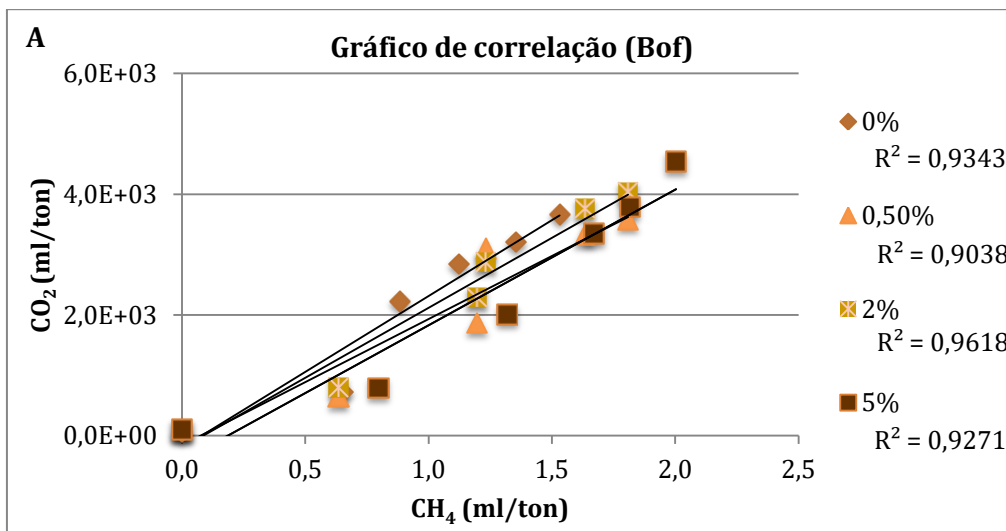


Figura 15A: Gráfico de dispersão e linhas de tendência entre as concentrações obtidas de CH₄ e CO₂ ao longo dos experimentos para as amostras (Bof) analisadas sob diferentes concentrações de sulfato.

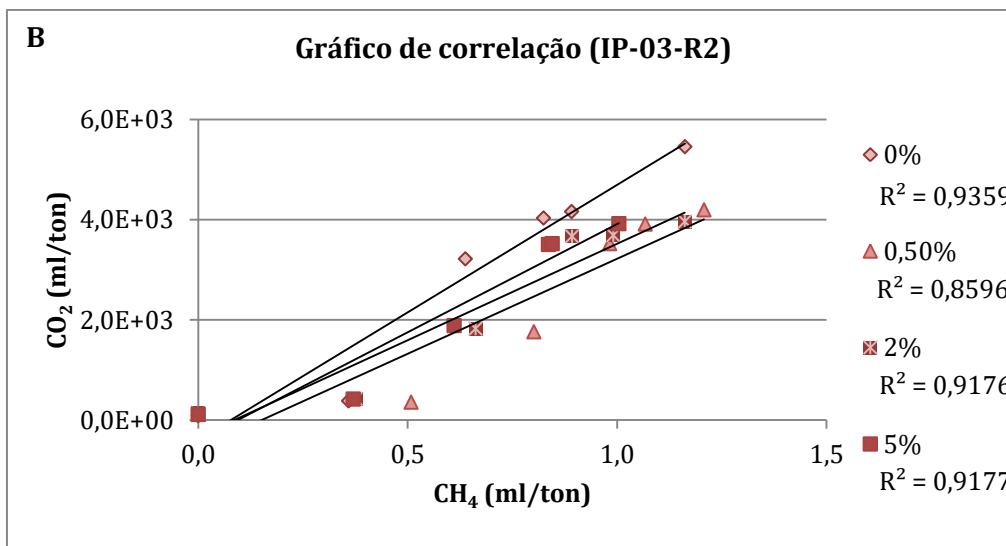


Figura 15B: Gráfico de dispersão e linhas de tendência entre as concentrações obtidas de CH₄ e CO₂ ao longo dos experimentos para as amostras (IP-03-R2) analisadas sob diferentes concentrações de sulfato.

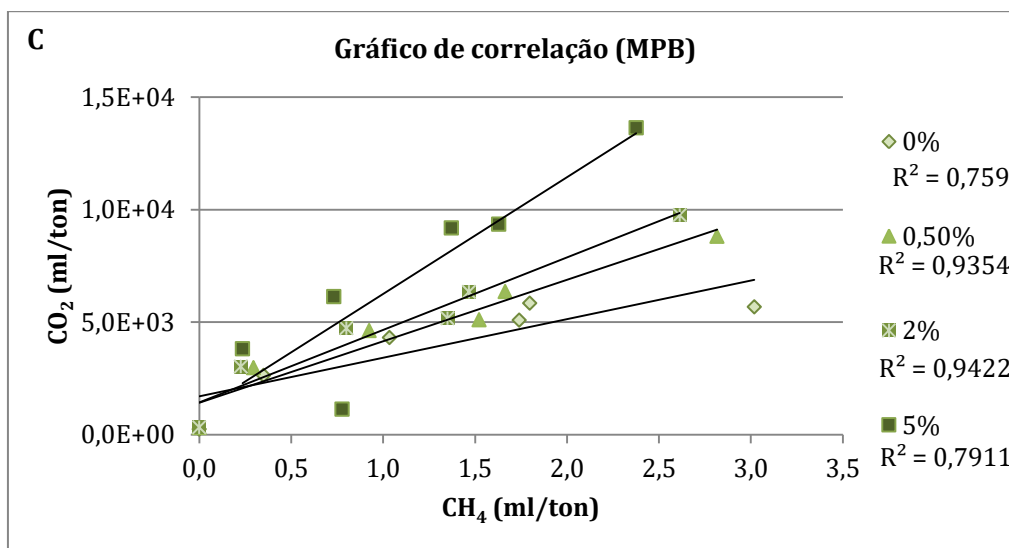


Figura 15C: Gráfico de dispersão e linhas de tendência entre as concentrações obtidas de CH₄ e CO₂ ao longo dos experimentos para as amostras (MPB) analisadas sob diferentes concentrações de sulfato.

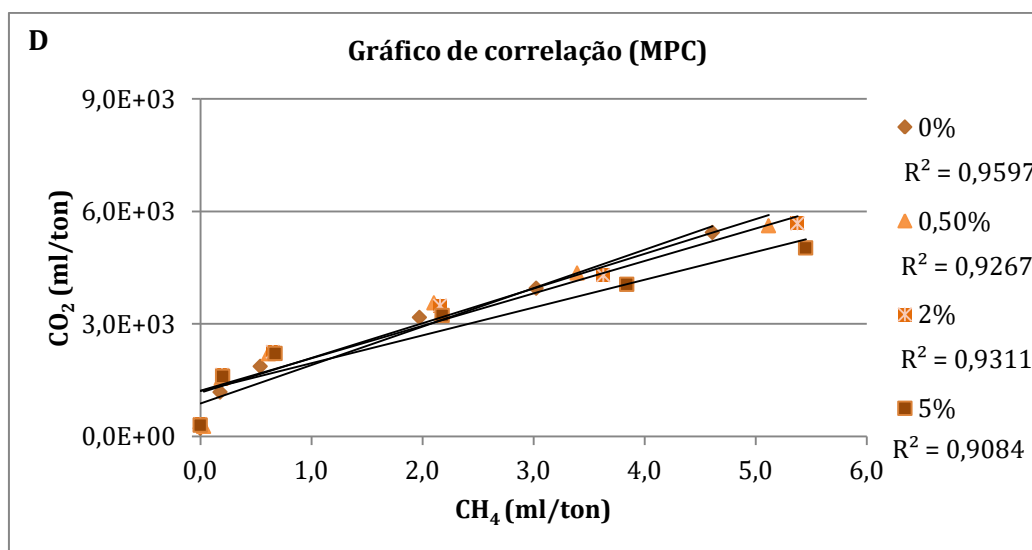


Figura 15D: Gráfico de dispersão e linhas de tendência entre as concentrações obtidas de CH₄ e CO₂ ao longo dos experimentos para as amostras (MPC) analisadas sob diferentes concentrações de sulfato.

6.5. Resultado das análises isotópicas

Resultados da assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ do carbono do CO₂ e CH₄, obtidos a partir dos experimentos (Tabela 7), foram plotados no gráfico adaptado de Milkov (2011), que correlaciona características isotópicas dos gases a campos de origem determinados (Figura 16). A área de resultados isotópicos obtidos está totalmente inserida no campo da geração termogênica de gases.

Tabela 7: Resultados das análises da assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ para o CO_2 e CH_4 obtidos nos experimentos de incubação sob condições úmidas.

AMOSTRA	$\text{CO}_2 \delta^{13}\text{C}$	$\text{CH}_4 \delta^{13}\text{C}$	Unidade
MPB_hum	-24,63	-48,92	‰PDB
MPC_hum	-23,74	-50,56	‰PDB

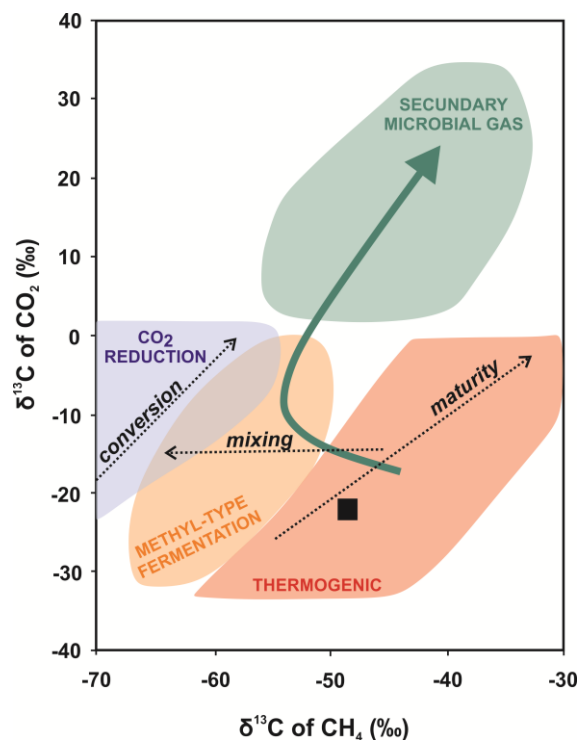


Figura 16 : Diagrama de $\delta^{13}\text{C}$ do CH_4 vs. $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 com os campos genéticos relacionados e campo de resultados obtidos (em preto). Modificado de Milkov (2011).

7. INTERPRETAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A ausência de fluxo de CH_4 e CO_2 através do solo, detectada com as análises de cromatografia gasosa, se mostra interessante no sentido de que, uma vez que foi confirmada produção de gases ao longo do tempo nos experimentos de incubação, esses gases seriam possivelmente consumidos no solo. Esse consumo poderia ser associado a reações bioquímicas, sendo os gases oxidados por ação de microorganismos metanotróficos e carbonotróficos (Nesbit et al., 1992) ou ainda adsorvidos na matriz mineral e confinados nos espaços porosos intergranulares. De acordo com a literatura, apenas um grupo seletivo de solos é associado a emissão de CH_4 , como solos de arrozais, de turfa (Sundh et al, 1995) e aterros sanitários (Whalen et al., 1990), enquanto a maioria é considerada sumidouros, onde predomina a metanotrofia em detrimento da metanogênese.

A partir dos resultados de cromatografia obtidos, pode-se confirmar, primeiramente, a influência positiva da água no processo de biodegradação de petróleo, uma vez que, as gerações de CH₄ e CO₂, principalmente no início dos experimentos, foram superiores em condições úmidas, em detrimento das secas. A correlação positiva obtida, entre metanogênese e umidade, pode ser associada ao papel da água em reações de hidrólise, transporte de nutrientes e outras funções catalisadoras para o processo de metanogênese (Reinhart, 1997).

Em relação ao sulfato, a partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o composto não exerceu um papel fundamental na metanogênese a partir do processo de biodegradação de petróleo acumulado em arenitos. Sendo assim, considera-se que o crescimento observado nos experimentos seria independente da concentração de sulfato, sendo considerada a possibilidade de existência de outros fatores controladores desse processo. Esse é um dado interessante, uma vez que estudos anteriores, como o de Oremland (1988) e Harada (1994), afirmam que a influência de sulfato no processo de biodegradação de compostos hidrocarbonetos, sob condições anaeróbicas, é de redução na produção de metano.

No entanto, seria interessante para estudos futuros o desenvolvimento de mais experimentos, avaliando diferentes concentrações e buscando uma rotina laboratorial de modo a garantir a reação do sulfato com o meio. De acordo com Colleran et al. (1995), o sulfato se faz como um aceptor de elétrons para bactérias sulfato redutoras em ambientes onde há a degradação anaeróbica de compostos orgânicos. Sendo assim, a redução de sulfato é associada a uma acidificação do meio, na presença de matéria orgânica (Reis et al., 1991). Uma vez que, dado que o pH se manteve inalterado ao longo desse estudo, o mesmo pode não ter reagido com o meio em reações de acidificação.

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, pode-se realizar uma estimativa de volume total de CH₄ que seria anualmente produzido a partir da biodegradação de petróleo em escala local, considerando-se as dimensões e características da área de estudo, conforme Thomaz Filho (1982). Conforme o autor, a área de ocorrência dos arenitos asfálticos é de cerca de 0,4 km², com uma espessura de 0,08 km, totalizando um volume de 0,032 km³ (Thomaz Filho, 1982). A densidade média usada para a estimativa no presente estudo foi calculada em laboratório a partir das amostras de arenito coletadas em campo, com valores próximos de 1,8 g/ml. Por fim, foi considerado um teor de óleo em peso de 5,5 % (Thomaz Filho, 1982) para cálculo do volume total de óleo da área em questão (cerca de 906 milhões de litros).

Assim, o cálculo baseia-se no volume de ocorrência é estimada de 5,7 milhões de barris de petróleo para a localidade de Anhembi (Thomaz Filho, 1982), considerando uma massa total de aproximadamente 57 milhões de toneladas de arenitos asfálticos. A partir disso, bem como de uma produção anual média sob condições que seriam naturalmente úmidas, sujeitas à precipitação

meteórica, dada suas profundidades rasas, e à presença de corpos hídricos subterrâneos, essa produção seria estimada em cerca de 17 ml de CH₄ por tonelada de material biodegradado, conforme experimentos realizados, o que resultaria em um valor de geração de aproximadamente 9,5 E⁷ ml de CH₄ por ano apenas na localidade de Anhembi.

É importante ressaltar que esse valor seria apenas uma aproximação e que poderia estar superestimado, uma vez que considera condições úmidas que não seriam, necessariamente, naturalmente homogêneas, estando suscetíveis a variações climáticas e sazonais, por exemplo.

Esses valores de produção podem parecer pouco relevantes em um primeiro cenário, se comparados a taxas de emissão de CH₄ e CO₂ a partir de sistemas petrolíferos reportadas por Etiope e Klusman (2002), cujos valores são da ordem de cerca de 600 Mt/ano. No entanto, o conhecimento e caracterização de fontes de contribuição biogênica na geração de CH₄ (e CO₂ como subproduto) têm uma importância fundamental na compreensão do *budget* desses gases a nível global.

Em relação aos coeficientes de correlação, conclui-se que há uma possível dependência entre a produção de CH₄ e CO₂ ao longo de todo o experimento, visto que os valores de coeficientes de correlação obtidos foram significativamente elevados. Os coeficientes de correlação de Pearson calculados indicam uma possível correlação positiva entre a geração de CO₂ e CH₄, porém deve-se levar em conta a possibilidade de atuação simultânea de processos independentes e microorganismos diferentes na geração desses gases, dando a falsa impressão de correlação.

Assim, uma possibilidade seria que o CO₂ parece ser resultado da metanogênese, associado a um sub-produto da geração de CH₄. Outra possibilidade seria a ocorrência de oxidação anaeróbia do metano nos experimentos de incubação, gerando CO₂ em escalas elevadas (Madigan et al., 2016). Isso também seria associado ao enriquecimento de ¹³C, explicando a assinatura isotópica mais pesada dos gases obtida nas análises realizadas (Kotelnikova, 2002; Whiticar, 1999).

Essa assinatura isotópica pesada dos gases biogênicos gerados durante os experimentos de incubação realizados, a qual seria, à primeira vista, discordante dos padrões de resultados esperados e definidos em Milkov (2011), já está prevista e descrita na literatura, podendo ser associada a alguns fatores de influência possíveis. Dentre esses fatores, pode-se considerar a oxidação anóxica do metano (Kotelnikova, 2002), o enriquecimento prévio em isótopos pesados do conteúdo orgânico biodegradado (Whiticar, 1999), ou ainda mistura de gases de outras fontes que poderiam estar adsorvidos na matriz mineralógica das amostras analisadas (Whiticar, 1999).

A partir dessa variada gama de fatores influentes na assinatura isotópica do CH₄ e CO₂, (Whiticar, 1999; Milkov, 2007), pode-se inferir que assinaturas isotópicas do metano gerado a partir

de campos de petróleo, sozinhas, podem ser equivocadas em termos de indicação de processos de origem (Jones, 2008), o que confere um caráter de uso restrito do método para essa finalidade, devendo-se fazer um uso restrito e criterioso do mesmo, a fim de se evitar interpretações errôneas.

Assim, os resultados das análises isotópicas abrem uma ampla discussão de caracterização da assinatura isotópica de gases e sua correlação com diferentes origens. A assinatura isotópica pesada do carbono do CH₄ e CO₂ obtidos poderia ser associada a variados fatores de influência, sendo necessária a realização de outras análises isotópicas, como δD, de experimentos para compreensão do fator de enriquecimento isotópico e de experimentos análogos, como a utilização de inibidores de atividade microbiana, tais como o ácido 2-brometanossulfônico, BES (Jones et al., 2008) e molibdato de sódio (Sherry et al., 2013), para se ter um controle negativo da geração biogênica de gases.

Por fim, a partir das taxas de produção de gases obtidas, pode-se estimar uma geração anual de cerca de 95 mil litros de CH₄ apenas na área de estudo. É importante considerar que a área usada para cálculo é restrita e a extensão da Formação Pirambóia com acumulações de petróleo, caso estudado, é de proporções bem maiores. Essas dimensões, associadas ao fator do tempo geológico, que atua na escala de milhões de anos, podem significar volumes muito maiores de gases gerados, impactando não só no meio ambiente, com possíveis emissões de gases de efeito estufa em reservatórios em contato direto com a atmosfera, mas também na geração de acumulações de gás natural, em um cenário de recursos energéticos.

Além disso, há casos de reservatórios análogos de petróleo ao redor do mundo, como as reservas provadas nos chamados *tar sands* do Canadá e Venezuela. Essas acumulações de petróleo também estariam submetidas a processos de biodegradação, consideradas suas particularidades e especificidades, o que aumenta a relevância desse impacto na geração de gases a nível global.

8. CONCLUSÕES

O presente estudo apresenta como contribuição científica a caracterização da geração de CO_2 e CH_4 a partir da biodegradação de petróleo de arenitos asfálticos da Formação Pirambóia, da Bacia do Paraná, bem como a avaliação da água e sulfato como fatores de influência nos experimentos realizados.

Pode-se concluir que, embora não tenha sido definida a existência de emissões desses gases para a atmosfera através do solo, há uma produção em subsuperfície com taxas consideráveis, quantificadas pelos experimentos e com uma média anual de cerca de 17 ml de CH_4 e 19 litros de CO_2 por tonelada de material biodegradado, sob condições na presença de água, tendo esta sido elencada como um fator catalisador fundamental no processo.

Esses dados de produção podem ser integrados com outros estudos similares realizados, de forma a se ter uma visão mais ampla de como esses processos atuam em diferentes reservatórios, como em Bertassoli et al. (2016), onde foi feita avaliação da geração de gases de origem biogênica a partir de folhelhos de diferentes unidades da Bacia do Paraná, obtendo-se taxas de geração de CH_4 de 17 ml/t•d e de 2.45×10^3 ml/t•d para CO_2 , sob condições secas, com produções até 50% e 151% maiores para condições úmidas, para CH_4 e CO_2 , respectivamente.

Assumindo a existência de outros reservatórios de petróleo análogos ao redor do mundo e o fator do tempo geológico na escala de milhões de anos, pode-se estimar um grande volume de gases que seria gerado e acumulado ao longo do tempo, o que poderia ter um grande reflexo tanto no cenário energético de formação de reservas de gás natural, quanto no cenário ambiental de emissão de gases para a atmosfera e contribuição para o efeito estufa, em escala global. No entanto, deve-se atentar para condições específicas de cada caso quando na extrapolação dos resultados obtidos nos experimentos aqui realizados, de forma a se evitar estimativas enviesadas.

Outra contribuição interessante diz respeito à melhor compreensão da influência do sulfato no processo de biodegradação de arenitos asfálticos, uma vez que, embora estivesse anteriormente descrito na literatura que a presença desse composto poderia causar uma redução das taxas de biodegradação (Oremland, 1988; Jones et al., 2008; Gray et al., 2010), esse efeito não foi observado nos resultados dos experimentos realizados, para as condições e concentrações utilizadas, tendo sido aqui definida a independência do sulfato nos resultados obtidos.

No entanto, vale ressaltar que poderia ser interessante a realização de novos estudos com outras concentrações de sulfato e maiores intervalos de tempo de análises para reavaliação de sua influência no processo, ou ainda, avaliação de outros parâmetros e nutrientes que poderiam influenciar, como temperatura, nitratos, S e Ca, por exemplo (Almeida, 2018). Também seria

interessante a avaliação da influência de outros tipos de sulfatos, como o sulfato de sódio (Na_2SO_4), com diferentes reatividades, que podem gerar resultados diferentes nos experimentos.

Em relação aos resultados isotópicos obtidos, pode-se concluir que é um método analítico que deve ser utilizado com critério, havendo a necessidade de se descrever minuciosamente os parâmetros de definição da origem dos gases a partir de suas assinaturas isotópicas, uma vez que há diversos fatores de influência do caráter isotópico do CH_4 e CO_2 (Milkov, 2007), podendo-se chegar a conclusões errôneas se baseadas em classificações genéricas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, N. S. (2018). *Influência da temperatura na geração biogênica de metano e dióxido de carbono na formação Irati, permiano da bacia do Paraná*. Tese (Doutorado). São Paulo: Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo.

Alperin, M.J.; Reeburgh, W.S.; Whiticar, M.J. (1988). Carbon and hydrogen isotope fractionation resulting from anaerobic methane oxidation. *Global Biochemistry*, 2, 279-288.

Aravena, R.; Wassenaar, L.I. (1993). Dissolved organic carbon and methane in a regional confined aquifer, southern Ontario, Canada: carbon isotope evidence for associated subsurface sources. *Applied Geochemistry*, 8, 483-493.

Balch, W.E.; Fox, G.E; Magrum, L.J.; Woese, C.R.; Wolfe, R.S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Review*, 43, 246-273.

Barker, J.F.; Fritz, P.(1999). Carbon isotope fractionation during microbial methane oxidation. *Nature*, 293, 289-291.

Bertassoli Jr., D.J.; Sawakuchi, H.O.; Almeida, N.S.; Castanheira, B.; Alema, V.A.T.; Camargo, M.G.P.; Krusche, A.V.; Brochsztain, S.; Sawakuchi, A.O. (2016). Biogenic methane and carbon dioxide generation in organic-rich shales from southeastern Brazil. *International Journal of Coal Geology*, 162, 1-13.

Bloch, S. (1994). Secondary porosity in sandstones: significance, origin, relationship to subaerial unconformities, and effect on predrill reservoir quality prediction. Reservoir quality assessment and prediction in clastic rocks. *Society for Sedimentary Geology*, 137-159.

Bokova, E.N. (1953). Formation of methane during microbial degradation of oil. *Polevaya Promyslovaya Geochimica*, 2, 25-27.

Cabral, C.V. (2006). *Análise de biomarcadores nos arenitos asfálticos da borda leste da Bacia do Paraná*. Tese de Mestrado. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Caetano-Chang, M.R. (1997). *A Formação Pirambóia no centro-leste do Estado de São Paulo*. Tese (Livre Docência). Rio Claro: Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

Claypool, G.E.; Kaplan, I.R. (1974). The origin and distribution of methane in marine sediments. *Natural Gases in Marine Sediments*, 99-139.

Colleran, E.; Finnegan, S.; Lens, P. (1995). Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie Leeuwenhoek*, 67 (1), 29-46.

Connan J. (1984). Biodegradation of crude oils in reservoirs. In: Brooks J and Welte D (Eds.), *Advances in Petroleum Geochemistry (v.1, 299-335)*. London: Academic Press.

Craig, H. (1953). The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 3, 53-92.

Dannenberg, S., Wudler, J., Conrad, R. (1997). Agitation of anoxic paddy soil slurries affects the performance of the methanogenic microbial community. *FEMS Microbial Ecology*, 22, 257–263.

Davidson, E.A.; Savage, K.; Verchot, L.V.; Navarro, R. (2002). Minimizing artifacts and biases in chamber-based measurement of soil respiration. *Agricultural and Forest Meteorology*, 113, 21-37.

Dlugokencky, E. J.; Steele, L.P.; Lang, P.M.; Masarie, K.A. (1994). The growth-rate and distribution of atmospheric methane. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 9, 17021-17043.

Etiopo, G.; Klusman, R. (2002). Geologic emissions of methane to the atmosphere. *Chemosphere*, 49, 777-789.

Ferreira M. P. (2010) *Condicionantes faciológicos e estruturais dos hidrocarbonetos da formação Pirambóia, Bacia do Paraná*. Monografia de trabalho de formatura. São Paulo: Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo.

Gray, N.D.; Sherry, A.; Hubert, C.; Dolfig, J.; Head, I.M. (2010). Methanogenic degradation of petroleum hydrocarbons in subsurface environments: remediation, heavy oil formation, and energy recovery. *Advances in Applied Microbiology*, 72, 137-161.

Harada, H.; Uemura, S.; Momoi, K. (1994). Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. *Water Research*, 28(2), 355-367.

Head I. M.; Jones D. M.; Larter S. R. (2003). Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature*, 426, 344-352.

Hettich M. (1981). Arenitos oleígenos da Formação Pirambóia. São Paulo - Segunda Parte: cadastramento regional de ocorrências: *Internal Report*, GEOSOL/SIX, São Mateus do Sul.

Horstad, I., Larter, S. R. e Mills, N. A. (1992). Quantitative model of biological petroleum degradation within the Brent Group reservoir in the Gullfaks field, Norwegian North Sea. *Organic Geochemistry*, 19, 1-117.

Huang H., Bowler B. F. J.; Oldenburg T. B. P.; Larter S. R. (2004). *Organic Geochemistry*, 35,1619.

Hutchinson, G.L.; Livingston, G.P. (1993). Use of chamber systems to measure trace gas fluxes. *Agricultural ecosystem effects on trace gases and global climate change*, 63-78.

IPCC, 2013: Climate Change. (2013). *The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press: Cambridge e Nova Iorque.

IPCC. Climate Change. (2014). *Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press: Geneva.

Jones, D.M.; Head, I.M.; Gray, N.D.; Adams, J.J.; Rowan, A.K.; Aitken, C.M.; Bennett, B.; Huang, H.; Brown, A.; Bowler, B.F.J.; Oldenburg, T.; Erdmann, M.; Larter, S.R. (2008). Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature*, 451, 176-180.

Khalil, K.; Mary, B.; Renault, P. (2004). Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soil aggregates as affected by O₂ concentration. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 687-699.

Kotelnikova S. (2002). Microbial production and oxidation of methane in the deep subsurface. *Earth Science Review*, 58(3), 367-395.

Loutfi, I.S.; Pereira, E; Rodrigues, R.; Cardozo, C.L. (2011). Controle tectonoestratigráfico dos processos de geração, migração e trapeamento do Sistema Petrolífero Irati-Rio Bonito, na região carbonífera de Santa Catarina. *Boletim de Geociências da Petrobrás*, 18 (2), 271-290.

Lueders, T.; Friedrich, M.W. (2002). Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 2484-2494.

Madigan, M. T.; Martinko, J.M.; Dunlap, P.V.; Clark, D.P (2016). *Microbiologia de Brock*. ArtMed: Porto Alegre.

- Milani E.J.; Brandão J. A. S. L.; Zalán P. V.; Gamboa L. A. P. (2001). Petróleo na Margem Continental Brasileira: Geologia, Exploração, Resultados e Perspectivas. *Brazilian Journal of Geophysics*, 18(3), 352-39.
- Milkov A.V.; Dzou L. (2007). Geochemical evidence of secondary microbial methane from very slight biodegradation of undersaturated oil in a deep hot reservoir. *Geology*, 35, 455-458.
- Milkov A.V. (2011). Worldwide distribution and significance of secondary microbial methane formed during petroleum biodegradation in conventional reservoirs. *Organic Geochemistry*, 42, 184–207.
- Nakai, N. (1960). Carbon isotope fractionation of natural gas in Japan. *Journal of Earth Sciences*, Nagoya University, 8, 174-180.
- Nesbit, S.P.; Breitenbeck, G.A. (1992). A laboratory study of factors influencing methane uptake by soils. *Agriculture, Ecosystems e Environment*, 41, 39-54.
- Okada, H. (1971). Classification of sandstone: Analysis and proposals. *Journal of Geology*, 79, 509-525.
- Oliveira A. F. (2012). *Paleotemperaturas e paleofluidos da Formação Irati na borda leste da Bacia do Paraná: implicações para a geração e migração de hidrocarbonetos*. Tese (Mestrado). São Paulo: Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo.
- Oremland. R.S. (1988). Biochemistry of methanogenic bacteria. *Biology of Anaerobic Microorganisms*, New York: A.J.B. Zehnder, 641-707.
- Ovsyannikov, V.M.; Lebedev, V.S. (1967). Isotopic composition of carbon in gases of biochemical origin. *Geochemistry International*, 4, 453-458.
- Reinhart, D.R., Townsend T.G. (1998) *Landfill Bioreactor Design and Operation*. CRC Press: Nova Iorque.
- Reis, M.A.M. (1991). *Redução biológica de sulfato em reactores acidogénicos - influência na metanogénese*. Tese (Pós Doutorado). Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- Rice, D.D. (1993). "Biogenic" gas: controls, habitats, and resource potential. *The Future of Energy Gases*. Washington: D.G. Howell, 583-606.
- Roadifer, R. E. (1987). *Exploration for Heavy Crude Oil and Natural Bitumen*. Tulsa: American Association of Petroleum Geologists.

Rosenfeld, W.M.; Silverman, S.R. (1959). Carbon isotope fractionation in bacterial production of methane. *Science*, 130,1658-1659.

Sackett, W.M. (1978). Carbon and hydrogen isotope effects during the thermocatalytic production of hydrocarbons in laboratory simulation experiments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42, 571-580.

Schoell, M. (1980). The hydrogen and carbon isotopic composition of methane from natural gases of various origins. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 44, 649-661.

Schoell, M. (1988). Multiple origins of methane in the Earth. *Chemical Geology*, 71, 1-10.

Sherry, A.; Graya, N.D.; Ditchfield, K.; Aitken, C.M.; Jones, D.M.; Rölinga, W.F.M.; Hallmann, C.; Larter, S.R.; Bowler, B.F.J.; Head, I.M. (2013). Anaerobic biodegradation of crude oil under sulphate-reducing conditions leads to only modest enrichment of recognized sulphate-reducing taxa. *International Biodeterioration e Biodegradation*, 81, 105-113.

Soares P.C. 1975. Divisão Estratigráfica do Mesozóico no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Geociências*, 5, 229-251.

Sundh, I.; Mikkela, C.; Nilsson, M.; Svenson, H. (1995). Potential aerobic methane oxydation in a sphagnum-dominated peatland - controlling factors and relation to methane emission. *Soil Biology e Biochemistry*, 27, 829-837.

Teixeira, C.A.S; Sawakuchi, A.O; Bello, R.M.S.; Nomura, S.F.; Bertassoli, D.J. e Chamani, M.A.C. (2018). Fluid inclusions in calcite filled opening fractures of the Serra Alta Formation reveal paleotemperatures and composition of diagenetic fluids percolating Permian shales of the Paraná Basin. *Journal of South American Earth Sciences*, 84, 242-254.

Thomaz Filho, A. (1982). Ocorrência de arenito betuminoso em Anhembi (SP) - cubagem e condicionamento geológico. *Congresso Brasileiro de Geologia*, 32, Salvador, Anais 5, 2344-2348.

Thomaz Filho, A.; Mizusaki, A. M. P.; Antonioli, L. (2008). Magmatism and petroleum exploration in the Brazilian Paleozoic basins. *Marine and Petroleum Geology*, 25, 143.

Thomaz Filho A.; Misuzaki A.M.P.; Antonioli L. (2008). Magmatismo nas bacias sedimentares brasileiras e sua influência na geologia do petróleo. *Revista Brasileira de Geociências*, 38(2 - suplemento), 128-137.

Vogel, T.M.; Oremland, R.S.; Kvenvolden, K.A. (1982). Low-temperature formation of hydrocarbon gases in San Francisco Bay sediment (California, U.S.A.). *Chemical Geology*, 37, 289-298.

- Wentworth, C. K. (1922). A scale of grade and class terms for clastic sediments. *Journal of Geology*, 30, 377-392.
- Whalen, S.C.; Reeburgh, W.S.; Sandbeck, K.A. (1990). Rapid methane oxidation in a landfill cover soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3405-3411.
- Whiticar, M.J.; Faber, E. (1985) Methane oxidation in sediments and water column environments: isotope evidence. *Organic Geochemistry*, 10, 759-768.
- Whiticar, M.J.; Faber, E.; Schoell, M. (1986). Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO₂ reduction vs. acetate fermentation-isotopic evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 50, 693-709.
- Whiticar, M.J. (1999). Carbon and Hydrogen Isotope Systematics of Bacterial Formation and Oxidation of Methane. *Chemical Geology*, 161, 291-314.
- Whitman, W.B.; Bowen, T.L.; Boone, D.R. (1991). The methanogenic bacteria. *The Prokaryotes*, Springer-Verlag. New York: K.-H. Schleifer, 719-767.
- Winters, J. C.; Williams, J. A. (1969). Microbial Alteration of Crude Oil in the reservoir. *American Chemical Society Division of Fuel Chemistry*, 14, 22-31.
- Wnger L. M., Davis C. L., Isaksen G.H. (2002). Multiple controls on petroleum biodegradation and impact on oil quality. *SPE Reservoir Evaluation and Engineering*, 5, 375-383.
- Zhou Shuqing Z., Haiping H., Yuming, L. (2008). Biodegradation and origin of oil sands in the Western Canada Sedimentary Basin. *Petroleum Science*, 5, 87-94.