

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**BIODETERIORAÇÃO DE MISTURAS DE DIESEL E
BIODIESEL E SEU CONTROLE COM BIOCIDAS**

Francielle Bucker
Bióloga - UFRGS

Julho, 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

BIODETERIORAÇÃO DE MISTURAS DE DIESEL E BIODIESEL E SEU CONTROLE COM BIOCIDAS

Francielle Bucker
Bióloga - UFRGS

Dissertação apresentada
como um dos requisitos para a
obtenção do Grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, RS, Brasil
Julho de 2009

Catálogo na Publicação

UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

B922b Bucker, Francielle

Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas / Francielle Bucker. – 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

*"O segredo é não correr atrás das borboletas...
É cuidar do jardim para que elas venham até você."*

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Fátima Menezes Bento a orientação, a amizade e a confiança depositada em mim durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais Marli e Wilmuth pelo constante incentivo.

Aos meus irmãos Letícia e Alessandro, pelo amor e companhia nos finais de semana.

A bolsista Naiara Santestevan pela grande contribuição ao trabalho e agradável convivência.

A família do apartamento 415.

Aos colegas de Laboratório no ICBS Alana, Igor, Taís, Luciana, Mica, Adriane, Fernanda, e no Solos Vanessa, Cátia, Andressa, Marcos pelo apoio, amizade e ajuda sempre que precisei.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela contribuição em minha formação acadêmica.

Ao CNPq e à CAPES pelo investimento.

Às empresas Ipiranga, Rohm and Hass e Miracema-Nuodex que gentilmente nos forneceram os produtos utilizados neste trabalho.

E agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o andamento do trabalho realizado durante esta etapa da minha formação profissional.

BIODETERIORAÇÃO DE MISTURAS DE DIESEL E BIODIESEL E SEU CONTROLE COM BIOCIDAS¹

Autor: Francielle Bucker
Orientador: Fátima Menezes Bento

Resumo

Durante o armazenamento, as vantagens do biodiesel tais como a biodegradabilidade, a afinidade pela água e a ausência de aromáticos, podem tornar o combustível ainda mais suscetível a contaminação microbiana, comprometendo a qualidade final do produto. Neste sentido, avaliou-se a suscetibilidade a biodeterioração de misturas de diesel com 5, 10 e 20% de biodiesel e de somente de biodiesel, por microrganismos isolados de tanques contaminados, e seu controle com biocidas. Em sistemas contendo meio mínimo mineral e misturas diesel/biodiesel, verificou-se que após 60 dias de crescimento, *Paecilomyces* sp. formou maior biomassa na formulação B20, *Aspergillus fumigatus* em B100, e, durante o tempo de crescimento de *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp., a maior biomassa foi formada em B100. *Candida silvicola* apresentou maior capacidade de degradação do biodiesel puro (B100) por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas. As concentrações de 10 e 100ppm apresentaram ação biocida, para os antimicrobianos isotiazolona e oxazolidina, respectivamente. A ação esporicida para ambos biocidas foi de 100ppm.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (147 p.) Julho, 2009.

BIODETERIORATION OF DIESEL AND BIODIESEL BLENDS AND ITS CONTROL WITH BIOCIDES²

Autor: Francielle Bucker

Orientador: Fátima Menezes Bento

Abstract

During the storage, the benefits of biodiesel such as biodegradability, the affinity with the water and the absence of aromatic hydrocarbons makes the fuel even more susceptible to microbial contamination, what affects the quality of the final product. In this sense, the susceptibility to biodeterioration of mixed diesel with 5, 10 and 20% biodiesel and pure biodiesel, by isolated microorganisms from contaminated tanks, and its control with biocides were evaluated. In systems containing minimal medium and mineral mixtures diesel / biodiesel, after 60 days of growth, *Paecilomyces* sp. formed more biomass in the formulation B20, *Aspergillus fumigatus* in B100. During the growth period of *Candida silvicola* and *Rhodotorula* sp., the largest biomass was formed in B100. *Candida silvicola* demonstrated great capacity of B100 degradation in evaluation by gas chromatography coupled to mass spectrometry. From the evaluation of minimum inhibitory concentration and biocide, it was determined that in mineral medium and diesel / biodiesel and biocide isotiazolona and the oxazolidina, concentrations of 10ppm and 100ppm were, respectively, esporicidas. The concentration of 100ppm, of the both products, was biocidal for the yeasts evaluated.

²Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (147 p.) July, 2009.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 Contaminação microbiana de combustíveis.....	4
2.1.1 Diesel e biodiesel:suscetibilidade a contaminação.....	5
2.2 Fatores que influenciam a contaminação microbiana de combustíveis.....	11
2.3 Biodegradação de combustíveis.....	14
2.4 Consequências da contaminação microbiana durante o armazenamento de combustíveis.....	22
2.5 Controle do desenvolvimento de populações microbianas em Combustíveis.....	23
3. Material e Métodos.....	33
3.1 Crescimento microbiano e misturas de diesel e biodiesel.....	33
3.1.1 Microrganismos.....	33
3.1.2 Combustíveis.....	33
3.1.3 Condições de cultivo para o crescimento microbiano.....	34
3.1.4 Fase aquosa.....	35
3.1.5 Fase oleosa.....	37
3.1.6 Curvas de crescimento de fungos filamentosos em misturas de diesel e biodiesel.....	38
3.1.7 Curvas de crescimento de fungos leveduriformes em misturas de diesel e biodiesel.....	39
3.1.8 Curvas de crescimento em meio de cultura.....	42
3.2 Controle do crescimento microbiano em misturas de diesel biodiesel utilizando biocidas.....	43
3.2.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima biocida (CMB).....	44
3.2.2 Avaliação do biocida sobre o crescimento dos microrganismos em misturas de diesel e biodiesel.....	47
3.2.3 Condições de cultivo.....	47
3.3 Análise estatística.....	48
4. Resultados.....	49
4.1 Curvas de crescimento dos fungos filamentosos em misturas de dielese biodiesel.....	49
4.1.2 Fase aquosa.....	54
4.2 Curva de crescimento dos fungos levedurifomes em misturas de diesel e biodiesel.....	62
4.2.1 Fase aquosa.....	66
4.3 Fase oleosa.....	68
4.4 Curvas de crescimento em meio de cultura.....	69
4.5 Controle do crescimento microbiano em misturas de diesel e biodiesel com o usode biocidas.....	75
4.5.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Biocida (CMB).....	75
4.5.2 Avaliação dos biocidas sobre o crescimento dos microrganismos em misturas de diesel e biodiesel.....	80

4.5.2.1 Isotiazolona.....	80
4.5.2.2 Oxazolidina.....	82
5. Discussão.....	86
5.1 Crescimento microbiano em misturas de diesel e biodiesel.....	86
5.1.1 Curvas de crescimento.....	86
5.1.2 Fase aquosa.....	91
5.1.3 Fase oleosa.....	98
5.2 Controle do crescimento microbiano em misturas de diesel e biodiesel com o uso de biocidas.....	102
6. Conclusões.....	109
7. Perspectivas	110
8. Referências Bibliográficas.....	111
9. Anexos.....	125
10. Vitta.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biocidas selecionados para a condução dos experimentos e algumas de algumas de suas características.....	44
Tabela 2. Concentração (mg.L^{-1}) dos biocidas isotiazolona, oxazolidina, dioxiborinana e ditiocarbamato em 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2;15,6; 7,8; 3,9; 1,9ppm.....	45
Tabela 3. Medidas de tensão superficial (mN.m^{-1}) obtidas para <i>Aspergillus fumigatus</i> , durante 60 dias, nas misturas de diesel e biodiesel (B0, B5, B10, B20 e B100). A tensão superficial inicial do meio mineral foi de 53, mN.m^{-1}	56
Tabela 4. Medidas de tensão superficial (mN.m^{-1}) obtidas para <i>Paecilomyces</i> sp., durante 60 dias, nas misturas de diesel e biodiesel (B0, B5, B10, B20 e B100). A tensão superficial inicial do meio mineral foi de 53, mN.m^{-1}	57
Tabela 5. Avaliação do efeito tampão do meio mineral M1, devido a presença na concentração de $4,45\text{g.L}^{-1}$, com quantidades crescentes de NaOH 1 N e HCl 1 N, em 25 mL do meio Mineral M1.....	62
Tabela 6. Medidas da tensão superficial (mN.m^{-1}) e medidas de pH da fase aquosa de tratamentos com <i>Candida silvicola</i> e <i>Rhodotorula</i> sp., e tratamento controle(em que não houve adição de inóculo).....	68
Tabela 7. Avaliação da degradação de biodiesel proveniente da avaliação de crescimento de microrganismos após 60 dias, para <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Paecilomyces</i> sp. e após 186 horas para <i>Rhodotorula</i> sp. e <i>Candida silvicola</i> em meio mínimo mineral e biodiesel.....	69
Tabela 8. Medidas da tensão superficial (mN.m^{-1}) e medidas de pH das curvas de crescimento em caldo malte de <i>Aspergillus fumigatus</i> e de <i>Paecilomyces</i> sp. e tratamento controle.....	70
Tabela 9. Medidas da tensão superficial e medidas de pH da fase aquosa de tratamentos com <i>Candida silvicola</i> e <i>Rhodotorula</i> sp., e tratamento controle ao final de 48 horas.....	74
Tabela 10. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) da isotiazolona diante de <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida silvicola</i> , <i>Paecilomyces</i> sp, e <i>Rhodotorula</i> sp.....	76
Tabela 11. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) do biocida ditiocarbamato diante de <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida silvicola</i> , <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhodotorula</i> sp.....	77

Tabela 12. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) da oxazolidina diante de <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida silvicola</i> , <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhodotorula</i> sp.....	78
Tabela 13. Comparação entre as CMI dos biocidas isotiazolona, ditiocarbamato e oxazolidina sobre os quatro microrganismos avaliados.....	79
Tabela 14. Comparação entre as CMB dos biocidas isotiazolona, ditiocarbamato e oxazolidina sobre os quatro microrganismos avaliados.....	79
Tabela 15. Comparação entre os tempos de morte de <i>Candida silvicola</i> diante das diferentes concentrações testadas do biocida isotiazolona , em diferentes misturas de diesel/biodiesel.....	82
Tabela 16. Comparação entre os tempos de morte de <i>Rhodotorula</i> sp. diante das diferentes concentrações testadas do biocida isotiazolona, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.....	82
Tabela 17. Comparação entre os tempos de morte de <i>Aspergillus fumigatus</i> diante das diferentes concentrações testadas do biocida isotiazolona , em diferentes misturas de diesel/biodiesel.....	82
Tabela 18. Comparação entre os tempos de morte de <i>Paecilomyces</i> sp diante das diferentes concentrações testadas do biocida isotiazolona, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.....	82
Tabela 19. Comparação entre os tempos de morte de <i>Candida silvicola</i> diante das diferentes concentrações testadas do biocida oxazolidina, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.....	84
Tabela 20. Comparação entre os tempos de morte de <i>Rhodotorula</i> sp. diante das diferentes concentrações testadas do biocida oxazolidina, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.....	84
Tabela 21. Comparação entre os tempos de morte de <i>A.fumigatus</i> diante das diferentes concentrações testadas do biocida oxazolidina, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.....	84
Tabela 22. Comparação entre os tempos de morte de <i>Paecilomyces</i> sp. diante das diferentes concentrações testadas do biocida oxazolidina, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.....	84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Degradação de alcanos. 1-n-alcanos monoxigenases. 2-álcool desidrogenase. 3- aldeído desidrogenase (Fritsche & Hofrichter, 2000).....15
- Figura 2. Etapas metabólicas básicas para degradação de hidrocarbonetos aromáticos (modificado de Schawartz e Leathen, 1976).....16
- Figura 3. Rotas básicas metabólicas da degradação de ésteres de ácidos graxos.....18
- Figura 4. Sítios específicos de inibição do biocida isotiazolona no Ciclo de Krebs.....27
- Figura 5. Frasco experimental (150 mL), contendo a fase aquosa e a fase oleosa do ensaio, na proporção de 1:1 v/v.35
- Figura 6. Curva de crescimento de *Aspergillus fumigatus* em meio mineral e somente biodiesel (B100) ou diesel (B0), durante 60 dias, a 28°C.(□) B0, (■) B100.....51
- Figura 7. Curva de crescimento de *Aspergillus fumigatus* em meio mineral em diferentes misturas de diesel e biodiesel durante 60 dias, a 28°C.(▲)B5, (◆)B10, (Δ) B20.....51
- Figura 8. Curva de crescimento de *Paecilomyces* sp. em meio mineral e somente biodiesel (B100) ou diesel (B0), durante 60 dias, a 28°C. (□) B0, (■) B100.....53
- Figura 9. Curva de crescimento de *Paecilomyces* sp. em meio mineral ediferentes misturas de diesel e biodiesel durante 60 dias, a 28°C. Símbolos; (▲)B5, (◆)B10, (Δ) B20.54
- Figura 10. Curva de crescimento de *Paecilomyces* sp.e medidas da tensão superficial, em tratamento com meio mineral e 100 % de biodiesel (B100), por 60 dias a 28°C. (□) Biomassa (mg); (◆)Tensão superficial do tratamento sem inóculo; (Δ)Tensão superficial do tratamento com inóculo.....58
- Figura 11. Curva de crescimento de *Paecilomyces* sp.e medidas da tensão superficial, em tratamento com meio mineral e mistura de diesel 20% de biodiesel de biodiesel (B20), por 60 dias a 28°C. (□)Biomassa (mg); (◆)Tensão superficial do tratamento sem inóculo; (Δ)Tensão superficial do tratamento com inóculo.....58

Figura 12. Valores das medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos B0, B5, B10 B20 e B100, sem inoculação de <i>Aspergillus</i> durante 60 dias, a 28 °C. (■) B0; (○)B5; (▲)B10; (●) B20, (□) B100.....	59
Figura 13. Valores das medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos B0, B5, B10 B20 e B100, com <i>Aspergillus fumigatus</i> durante 60 dias, a 28 °C. Símbolos: (■) B0; (○)B5; (▲)B10; (●) B20, (□) B100.....	60
Figura 14. Medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos contendo misturas de diesel e biodiesel, diesel ou biodiesel, na presença de <i>Paecilomyces</i> sp. acompanhadas por 60 dias, a 28 °C. (■) B0; (○)B5; (▲)B10; (●) B20, (□) B100.....	61
Figura 15. Valores das medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos contendo misturas de diesel e biodiesel, diesel ou biodiesel, sem <i>Paecilomyces</i> sp. acompanhadas 60 dias, a 28 °C. (■) B0; (○)B5; (▲)B10; (●) B20, (□) B100.....	61
Figura 16. Curva de crescimento de <i>Candida silvicola</i> , para tratamento com meio mineral e 100% de biodiesel (B100) e 20% de biodiesel (B20.) (▲)B100; (Δ) B20.....	65
Figura 17. Curva de crescimento de <i>Rhodotorula</i> sp., para tratamento com meio mineral e 100% de biodiesel (B100) e 20% de biodiesel (B20.) (▲)B100; (Δ) B20.....	65
Figura 18. Curva de crescimento de <i>Aspergillus fumigatus</i> , em meio de cultura caldo malte, avaliada durante 60 dias, a 28° C.....	70
Figura 19. Curva de crescimento de <i>Paecilomyces</i> sp., em meio de cultura caldo malte, avaliada durante 60 dias, a 28° C.....	70
Figura 20. Curva de crescimento de <i>Candida silvicola</i> , em caldo GYMP. Avaliada por 48 horas.....	73
Figura 21. Curva crescimento de <i>Rhodotorula</i> sp., em caldo GYMP. Avaliada por 48 horas.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ASTM	American Society for Testing and Materials
ANP	Agência Nacional do Petróleo
CMB	Concentração Mínima Biocida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
EUA	Estados Unidos da América
mg	Miligrama
mL	Mililitro
TPF	Trifenil Formazan
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólio
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
°C	Grau Celsius
atm	Atmosfera
µm	Micrometro
mN.m⁻¹	miliNewton por metro

1. INTRODUÇÃO

O uso de combustíveis derivados de fontes renováveis de energia, como o biodiesel, tem sido amplamente estimulado em muitos países e as projeções mundiais assinalam uma crescente substituição de combustíveis de origem fóssil pelos de origem renováveis. Nesse sentido, verifica-se a expansão do mercado de produtos combustíveis derivados de fontes renováveis, no mundo todo, predominando o etanol, para uso em automóveis, e o biodiesel para caminhões, ônibus, tratores, transportes marítimos, nos quais, atualmente, o óleo diesel é o combustível mais utilizado. Além de diversificar a matriz energética, o uso de biodiesel apresenta algumas vantagens sobre os combustíveis derivados do petróleo, tais como: ser livre de enxofre e de compostos aromáticos; apresentar teores médios de oxigênio, favorecendo uma combustão mais completa; maior ponto de fulgor, tornando-o mais seguro; menor emissão de partículas, HC, CO e CO₂ diminuindo as emissões de gases do efeito estufa; ter caráter não tóxico e ser biodegradável. As características físico-químicas do biodiesel permitem que ele seja adicionado ao diesel, no Brasil a mistura, atualmente é de 3% de biodiesel ao diesel, sendo denominada B3. A perspectiva no cenário nacional é de que o percentual de biodiesel adicionado ao óleo diesel seja aumentado em mais 1%

a partir de julho de 2009, ou seja, para 4% (B4) a mistura do combustível renovável com o óleo diesel.

Embora o uso de biodiesel apresente muitas vantagens, algumas de suas propriedades podem lhe conferir desvantagens, em relação ao óleo diesel, pois este é relativamente inerte, e mantém as suas características pouco alteradas ao longo da estocagem, quando comparado ao biodiesel, que degrada com mais facilidade ao longo do tempo, comprometendo sua utilização. Podem ocorrer alterações nas propriedades físico- químicas do biodiesel (B100) e das misturas binárias, decorrentes de processos de degradação como a oxidação, que acarretam em elevação da acidez, do potencial de corrosividade e a formação de sedimentos durante a estocagem do produto, além da oxidação, o combustível está sujeito a biodeterioração. Durante a estocagem, a presença de água livre torna-se um problema, pois o biodiesel se caracteriza por ser capaz de absorver água, o que potencializa sua tendência natural a oxidação, além disso, a presença de água nos lastros dos tanques favorece o crescimento de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras. Estes fatores associados podem comprometer a qualidade final do combustível estocado, além de causar problemas como entupimento de filtros e bicos injetores, e levar a corrosão interna dos tanques. Devido a danos no tanque de armazenamento, decorrentes tanto da corrosão interna, quanto da corrosão externa, podem ocorrer acidentes como vazamento de combustíveis, comprometendo o solo e os aquíferos.

Algumas medidas podem ser tomadas para que os problemas sejam evitados, tais como, a drenagem da água e limpeza dos tanques, ambas podem reduzir a possibilidade de desenvolvimento de sedimentos, de origem

biológica, durante o armazenamento. Além disso, pode-se adicionar aos combustíveis produtos específicos com atividade antimicrobiana, - os biocidas - que podem prevenir a contaminação, e em casos de tanques de estocagem com sedimento microbiano presente, podem auxiliar na erradicação dos microrganismos.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade à biodeterioração durante o armazenamento simulado das misturas de óleo diesel com 5, 10, 20 e 100% de biodiesel e sem biodiesel, utilizando microrganismos isolados de diesel biodiesel, avaliando a capacidade de crescimento e de degradação de ésteres do biodiesel (B100), a produção de metabólitos oriundos do crescimento dos microrganismos presentes, e avaliar a eficácia de biocidas comercialmente disponíveis no mercado, como uma forma de controle da contaminação microbiana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação microbiana de combustível

Os primeiros estudos sobre a utilização de derivados do petróleo por microrganismos datam do final do século passado, com o primeiro registro para o crescimento do fungo *Botrytis cinerea*, em parafina, um dos constituintes do fracionamento do óleo cru, (Myoshe, 1895), citado por Schwartz & Leathen (1976). Kaserer & Sohngen (1906), citados por Videla (1981), registraram a oxidação do metano por uma bactéria, atualmente conhecida como *Pseudomonas methanica*. A oxidação bacteriana também foi evidenciada em gasolina (C₅ - C₉) e querosene (C₁₀ - C₁₈) (Sohngen, 1915, citado por Videla, 1981).

Bushnell & Haas (1941) desenvolveram um meio mineral simples com o objetivo de isolar os microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Esses autores encontraram que petróleo, querosene, gasolina, óleos minerais e a parafina podem ser usados como fonte de carbono por diversos microrganismos (Davis, 1967).

A partir da década de 40, em função da substituição da gasolina pelo querosene na aviação, começaram a surgir trabalhos de investigação principalmente sobre a origem e composição biológica dos sedimentos formados durante a estocagem dos combustíveis. As primeiras referências

sobre a relação da corrosão e a presença de microrganismos em combustíveis datam do final da década de 50. Um dos primeiros trabalhos realizados sobre a natureza microbiana dos resíduos em tanques de combustível em aeronaves, foi realizado por Bakanaukas em 1958, com amostras de diferentes bases da Força Aérea dos Estados Unidos. Hendey (1964) investigou a relação do fungo contaminante de querosene, *Cladosporium resinae* com a corrosão de ligas de alumínio. No Brasil, a primeira referência de investigação da natureza dos sedimentos, foi com o isolamento do fungo *Cladosporium resinae* em tanques de querosene (Gutheil, 1966). A análise dos sedimentos apresentou microrganismos, resíduos metabólicos e substâncias surfactantes (Prince, 1961; Davis, 1967; Videla, 1981; Williams *et al.*, 1991).

Os sistemas mais documentados pela literatura referem-se a aeronaves, onde os problemas de desenvolvimento microbiano são mais preocupantes, pelos riscos que apresentam como a obstrução das linhas de combustível e filtros (Do Valle & Videla, 1992). A contaminação do óleo diesel naval tem sido especialmente investigada, quanto à composição do material particulado que bloqueia o sistema de filtragem e estocagem em navios, mas a corrosão também tem sido abordada (Bruce, 1982; Neihof & May, 1983). A constatação da suscetibilidade da gasolina à contaminação microbiana durante a estocagem, também tem sido avaliada, assim como a possibilidade de controle pelo uso de biocidas (Passman *et al.*, 2001).

2.1.1 Diesel e biodiesel: suscetibilidade a contaminação

O óleo diesel é um derivado de petróleo de grande consumo, principalmente na economia de vários países, devido a sua importância no transporte rodoviário e marítimo. Trata-se de um dos combustíveis, derivados

do petróleo, mais suscetíveis a presença de sedimentos de origem biológica e química (goma e óxidos de ferro) (Rogers & Kaplan, 1982; Smith, 1991; Bento *et al.*, 1999; Gaylarde *et al.*, 1999). A estabilidade química está relacionada à natureza dos hidrocarbonetos que compõem o óleo diesel (parafínico, naftênico, aromático e olefínico). A presença de compostos quimicamente instáveis como os nitrogenados, responsáveis pela alteração da cor; sulfurados e hidrocarbonetos reativos, como aromáticos e oleofinas, sofrem reações de oxidação que provocam a degradação do produto (Batts & Fathoni, 1991; Cid *et al.*, 1994). Alguns ácidos (carboxílico, fenólico e sulfônico) produzidos através da oxidação do combustível, catalisam as reações de formação de sedimentos de origem química na presença simultânea de aromáticos (Cid *et al.*, 1994). Essa constatação permite entender o efeito sinérgico derivado da mistura desses compostos, e sua relativa instabilidade. Para a liberação do produto no mercado, são realizados vários testes como determinação da cor, de água e de sedimentos, cinzas, do ponto de fuligem, do ponto de fulgor, etc. Entre os vários ensaios realizados, o da corrosividade avalia o óleo diesel quanto a sua ação corrosiva em contato com metais. O enxofre livre, compostos de enxofre e ácidos livres são os maiores causadores de ataque aos metais, sendo sua eliminação, portanto, uma das maiores preocupações dos refinadores (Bianco, 1998).

O uso de aditivos, no combustível diesel, com características emulsificantes, pode promover a dispersão do material biológico (biofilmes) aderido nas paredes dos tanques. Esta remoção pode levar a um aumento na frequência de troca de filtros devido a maior saturação provocada pela quantidade de particulados em suspensão no óleo (Batts & Fathoni, 1991). A

dispersão do material aderido leva a uma maior exposição dos equipamentos metálicos, tornando-os mais suscetíveis ao processo de corrosão e também disponibilizando mais material orgânico aos microrganismos de um sistema contaminado. Por outro lado, a remoção do biofilme protege o material metálico dos agentes e do processo corrosivo que é causado pela instalação desta película biológica. O efeito de um óleo diesel aditivado, comercializado por uma distribuidora, foi avaliado no crescimento de fungos isolados de um combustível contaminado. Conforme resultados obtidos, não foi constatada influência na inibição e/ou promoção do crescimento dos microrganismos, quando comparado com óleo diesel sem aditivo (Bento & Gaylarde, 1996; Bento & Gaylarde, 1998).

A possibilidade de uso de óleos vegetais como combustível é conhecida desde o final do século XIX. No entanto, combustíveis baseados em óleos vegetais passaram a ter importância após a crise do petróleo na década de 1970, quando os óleos vegetais, de grande importância na indústria alimentar, passaram a ser testados como combustível, considerando-se uma alternativa ao diesel de petróleo (Schleicher *et al.*, 2009). No entanto, algumas características do biodiesel podem torná-lo ainda mais vulnerável a biodegradação, do que o diesel de petróleo (Passmann, 2005).

Desde 1911 já se cogitava a possibilidade de uso de óleos vegetais como combustível, conforme Rudolph Diesel “o motor diesel pode ser alimentado com óleos vegetais e poderá ajudar consideravelmente o desenvolvimento da agricultura nos países onde ele funcionar. Isto parece um sonho do futuro, mas eu posso predizer com inteira convicção que esse modo de emprego do motor diesel pode num dado tempo, adquirir uma grande

importância". No Brasil o uso do biodiesel, derivado de plantas oleaginosas, tornou-se obrigatório com a Lei 11.097/2005 que introduziu o biodiesel à matriz energética brasileira, ao determinar a mistura obrigatória de 2% de biodiesel (B2) ao óleo diesel comercializado em qualquer parte do território nacional, a partir de janeiro de 2008. A partir de 1º de Julho de 2008, a mistura do biocombustível no diesel passou a ser de 3%, sendo denominado B3. As bases do Programa Nacional de Produção e Uso de BIODIESEL apresentam a Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005, que fixou em 5% o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final no Brasil a partir de 2013. O biodiesel é um combustível produzido a partir de óleos vegetais extraídos de diversas matérias primas renováveis como palma, mamona, soja, girassol, dentre outras; e pode também ser produzido a partir de gordura animal (Macedo & Macedo, 2004; Marchetti *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Murugesan *et al.*, 2009 a, b).

A constituição química do biodiesel é de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos de cadeia longa, os quais são obtidos, respectivamente, pela transesterificação dos triacilglicerídeos (derivados de óleos vegetais ou de gordura animal) com metanol ou etanol. No processo de transesterificação, a reação entre os triacilglicerídeos e o álcool é catalisada por um ácido, ou uma base, ou uma enzima (lipase), resultando na produção do biodiesel e de subprodutos como o glicerol (Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis, Portaria nº 255 ANP, 2003; Macedo & Macedo, 2004; Marchetti *et al.*, 2007; Murugesan *et al.*, 2009 (a, b); Sharma *et al.*, 2008). As propriedades físico químicas do biodiesel são similares àsquelas do diesel derivado do petróleo (Marchetti *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Murugesan *et*

al., 2009 b). Assim, a grande compatibilidade dos ésteres de ácidos graxos (que podem ser de origem metélica ou etélica, dependendo do álcool empregado em seu processo de produção) com o diesel convencional, os caracteriza como uma alternativa capaz de atender à maior parte da frota de veículos diesel já existente no mercado; e, quando utilizados em misturas com o diesel de petróleo, do tipo B2, B5 ou B20, não há necessidade de investimento tecnológico para o desenvolvimento ou adaptação dos motores (Biodiesel: Handling and Use Guidelines, 2004; Gerpen *et al.*, 2004).

A baixa complexidade estrutural do biodiesel é devida a sua composição ser predominantemente de oito diferentes ácidos graxos (C16-18) metil esterificados, incluindo oleato, palmitato, estearato, linoleato, mirístico, laureato e linolenato, e a concentração de cada ácido graxo varia de acordo com a fonte de origem do biodiesel (Murugesan *et al.*, 2009 a, b). No entanto, perfil de ácidos graxos do óleo de soja favorece o processo de oxidação deste biocombustível, devido a quantidade de ácidos graxos insaturados, principalmente ácido linoléico (C18:2) (53%), oléico (C18:1) (23%), palmítico (11%), linolênico (C18:3) (8%) e esteárico (C18:0) (4%) (Domingos *et al.*, 2007). O processo de degradação oxidativa do biodiesel pode ser ativado pela luz, ou seja, está sujeito a degradação por foto-oxidação. Este tipo de oxidação é um mecanismo que envolve a adição direta de oxigênio singlete ($\cdot O_2$) aos ácidos graxos insaturados. O oxigênio singlete reage diretamente com as duplas ligações presentes no óleo, produzindo hidroperóxidos (Ferrari & Souza, 2009). Estes hidroperóxidos, por sua vez, podem levar a corrosão dos sistemas de armazenamento, por exemplo (Knothe, 2007). Além da foto – oxidação, o biodiesel tende a se oxidar sob influência de outras condições abióticas como

calor, umidade, ar atmosférico e metais. Uma das conseqüências da oxidação é o aumento da viscosidade do biodiesel, resultado de reações de condensação envolvendo as duplas ligações, e que leva a formação de gomas e sedimentos, acarretando o entupimento de filtros e sistemas de injeção (Knothe, 2007). Desta forma, algumas medidas podem ser tomadas para aumentar a resistência a degradação oxidativa como a aplicação de antioxidantes (Domingos *et al.*, 2007; Knothe, 2007; Ferrari & Souza, 2009). O uso por exemplo de antioxidantes efetivos pode aumentar a estabilidade do biodiesel de soja, assim, antioxidantes sintéticos como o TBHQ (*tert* – butyl hydroxyquinone), BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole), PG (propylgallate) foram testados como forma de evitar a oxidação em biodiesel proveniente de óleo de soja, de palma, girassol, apresentando potencial estabilizador (Dunn, 2005; Liang *et al.*, 2006; Domingos *et al.*, 2007; Ferrari & Souza, 2009, Xin, 2009).

O biodiesel apresenta uma grande afinidade com água, esta propriedade higroscópica do produto eleva consideravelmente seu teor de água simplesmente ao entrar em contato com a umidade do ar (Gerpen *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2006). Vieira *et al.* (2006) verificaram que a capacidade de absorção de água do biodiesel é cerca de trinta vezes maior do que a capacidade de absorção do diesel de petróleo; Gerpen *et al.* (1997) constataram que o biodiesel de soja é capaz de absorver 40 vezes mais água do que o diesel. Posteriormente, Vieira *et al.* (2007) constataram que a capacidade de absorção de água, em misturas biodiesel e diesel, aumenta com o aumento do teor de biodiesel.

Uma vantagem do biodiesel (do ponto de vista ambiental), em relação ao diesel de petróleo, é sua maior biodegradabilidade, que estaria relacionada à ausência de moléculas aromáticas, disponibilidade de pontes éster de alta energia, e às propriedades higroscópicas. No entanto esta biodegradabilidade também o torna mais suscetível à contaminação microbiana do que os combustíveis fósseis, durante o período de armazenamento (Chesneau, 2000; Passmann, 2005; Bento *et al.*, 2006).

2.2 Fatores que influenciam a contaminação microbiana de combustíveis

A contaminação microbiana de combustíveis armazenados, e seu conseqüente crescimento em um sistema de estocagem, é influenciada por diversos fatores. A formação de sedimentos biológicos está relacionada a condições adequadas de umidade e nutrientes, além disso, fatores como oxigênio, temperatura e pH também influenciam. Associado a essas condições, o crescimento microbiano depende da capacidade de alguns microrganismos utilizarem o carbono presente nos combustíveis para seu crescimento.

A presença de água é fundamental para o início do desenvolvimento microbiano, assim, na concentração de apenas 1% em um sistema de armazenamento, é suficiente para o crescimento de microrganismos (Chesneau, 2000; Gaylarde *et al.*, 1999). A água presente em um tanque de estocagem pode vir acompanhando o próprio combustível durante seu transporte, pode penetrar no sistema durante operações de carga e descarga, pode entrar através de sistema de ventilação imprópria ou com vedação deficiente, e através da condensação das gotículas de água do ar. Iniciado o

crescimento microbiano, o metabolismo celular libera água, provocando seu acúmulo no sistema (Chesneau, 2000; Gaylarde *et al.*, 1999).

Na ausência de água, o microrganismo pode sobreviver, por ser capaz de gerar estruturas de resistência, mas não se desenvolve caso a disponibilidade de nutrientes minerais seja limitada. Então, além da água, nutrientes minerais (fósforo, potássio, magnésio e outros microelementos) também são limitantes ao crescimento microbiano em sistemas de armazenamento; conforme Gaylarde *et al.* (1999) os fosfatos estão presentes no combustível em concentrações inferiores a 1 mg.mL^{-1} . Os nutrientes minerais podem penetrar através de partículas de poeira carregadas pelo vento, entradas eventuais de insetos ou outros animais pequenos nos tanques com combustíveis. O combustível pode conter inibidores de corrosão, tais como compostos fosfatados, que podem atuar como fontes de nutrientes e a própria água, que pode apresentar sais inorgânicos em solução (Reddy, 1988; Smith, 1991; Bento, 2001).

Uma população microbiana, ao encontrar condições adequadas de água e de nutrientes, é capaz de se desenvolver em um tanque de armazenamento em uma ampla faixa de temperatura e de pH – respectivamente a partir de 4°C até 60°C e de pH 4 a pH 9 (Chung *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2006; Yemashova *et al.*, 2007). Os metabólitos ácidos, provenientes do metabolismo microbiano, têm sido apontados como um fator que reduz o pH da fase aquosa em tanques de armazenamento de óleo diesel, o que pode acelerar o processo de corrosão interna dos tanques (Videla, 1994). Além disso, estes produtos são responsáveis pela formação de depósitos e gomas nos bicos injetores, acarretando uma menor eficiência no motor. Assim

como o processo de oxidação pode gerar aldeídos, cetonas e ácidos, o crescimento de microrganismos, em um sistema de estocagem de combustíveis de diesel e biodiesel pode levar a produção destes compostos (Dunn, 2005).

A presença de oxigênio em tanques de armazenamento é comum, pois sua entrada no sistema ocorre durante a reposição do combustível, pela própria ventilação dos tanques (Yemashova *et al.*, 2007). Sua presença no sistema favorece o processo de biodegradação aeróbia (tendo o oxigênio como acceptor final de elétrons) propiciando o crescimento microbiano. No entanto, o processo de biodegradação pode ser anaeróbio, neste caso o acceptor final de elétrons podem ser os compostos sulfurados presentes no diesel, permitindo o crescimento de bactérias redutoras de sulfato (Bento & Gaylarde, 2001).

Para que o processo de biodegradação se desenvolva é necessário que no sistema existam microrganismos com a capacidade de utilizar o diesel e/ou biodiesel como fonte de carbono. A população microbiana com competência para degradá-los pode entrar no sistema através do sistema de ventilação ou de bombeamento, pois são microrganismos presentes tanto no ar, como no solo e na água (Yemashova *et al.*, 2007). Muitas espécies de microrganismos aeróbios (bactérias, leveduras e fungos) já foram isoladas de sistema de estocagem de combustíveis. Entre as bactérias aeróbias se podem citar os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Aeromonas* (Gaylarde *et al.*, 1999; Bento & Gaylarde, 2001; Passmann, 2003; Vieira *et al.*, 2006). O crescimento de bactérias anaeróbias, como as bactérias redutoras de sulfato (BRS) e bactérias denitrificantes (BDN), também foi detectando em tanques de estocagem

(Gaylarde *et al.*, 1999). Leveduras e fungos filamentosos dos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Hormoconis*, *Penicillium*, *Alternaria* – entre outros- já foram isolados de tanques de armazenamento (Bento & Gaylarde, 2001; Passmann, 2003; Miranda *et al.*, 2007).

2.3 Biodegradação de combustíveis

A biodegradação refere-se ao processo pelo qual os microrganismos utilizam o composto orgânico como uma fonte de carbono e energia. Na biodegradação os compostos são facilmente quebrados em moléculas mais simples encontradas no ambiente, tal como o dióxido de carbono e água, ou em alguns casos, a atividade metabólica muda a forma química do composto (biotransformação), mas não resulta na mineralização (Atlas & Bartha, 1996).

O processo de biodegradação de compostos derivados de petróleo, como o óleo diesel, que contém compostos recalcitrantes ao ataque de microrganismos, inicia nas moléculas com estrutura química mais simples, ou seja, nos n-alcenos. A ordem de degradação dos hidrocarbonetos derivados de petróleo é a seguinte: n-alcenos > alcenos ramificados > aromáticos de baixa massa molecular > ciclo alcenos > aromáticos de alta massa molecular (Vieira *et al.*, 2006). Assim, na maioria dos casos a degradação inicia com a oxidação dos grupos metila das extremidades, a álcoois primários. Estes álcoois primários são então oxidados a aldeídos, os quais, sob ação de enzima NAD-desidrogenase, são oxidados aos seus correspondentes ácidos graxos. Estes por sua vez, são degradados por β - oxidação, ou são utilizados pela célula (Sharma & Pant, 2000). As etapas de conversão de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos presentes no óleo diesel podem ser observadas nas Figuras 1 e 2.

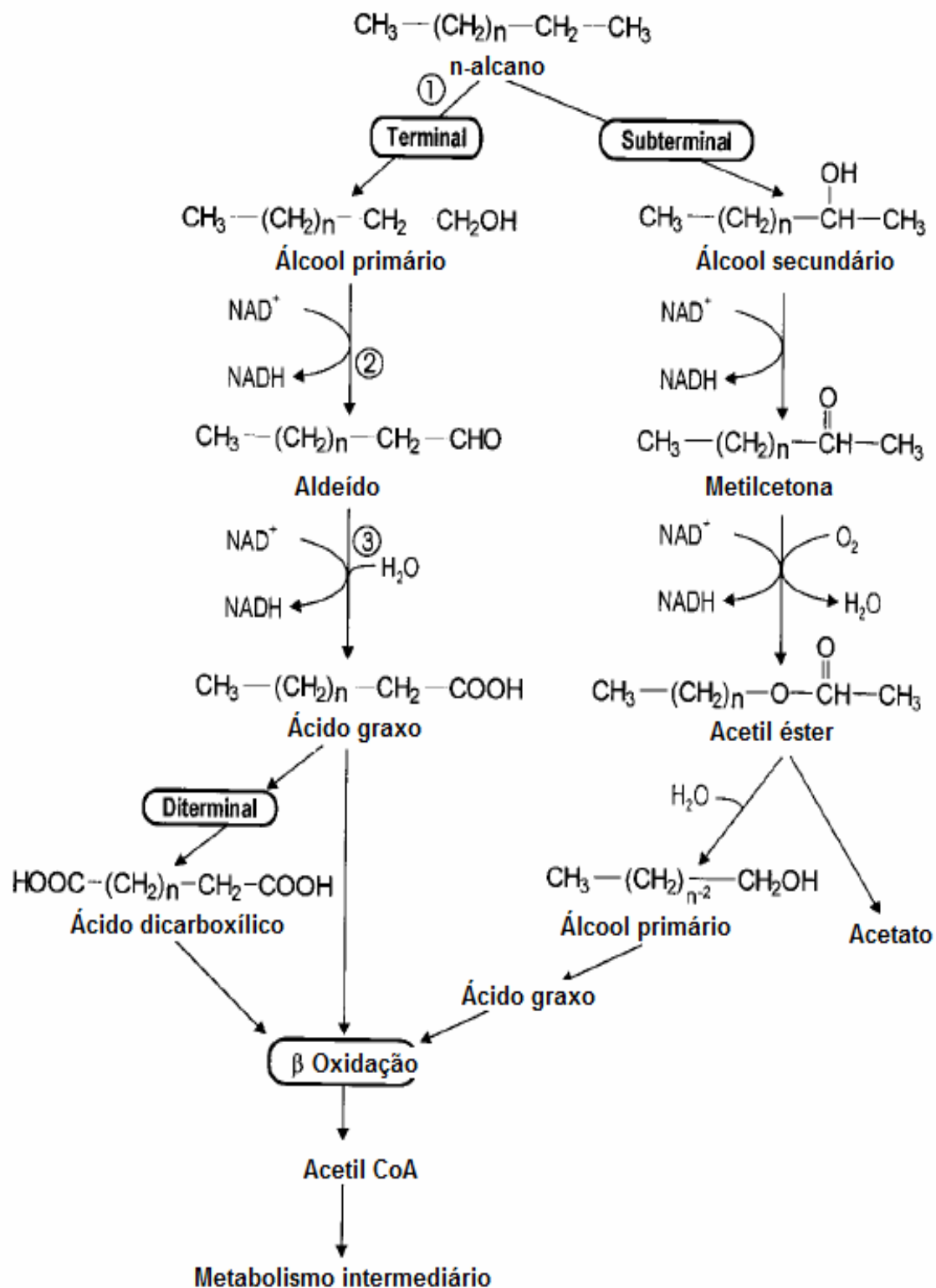


Figura 1. Degradação de alcanos. 1-n-alcanos monoxigenases. 2-álcool desidrogenase. 3- aldeído desidrogenase (Fritsche & Hofrichter, 2000).

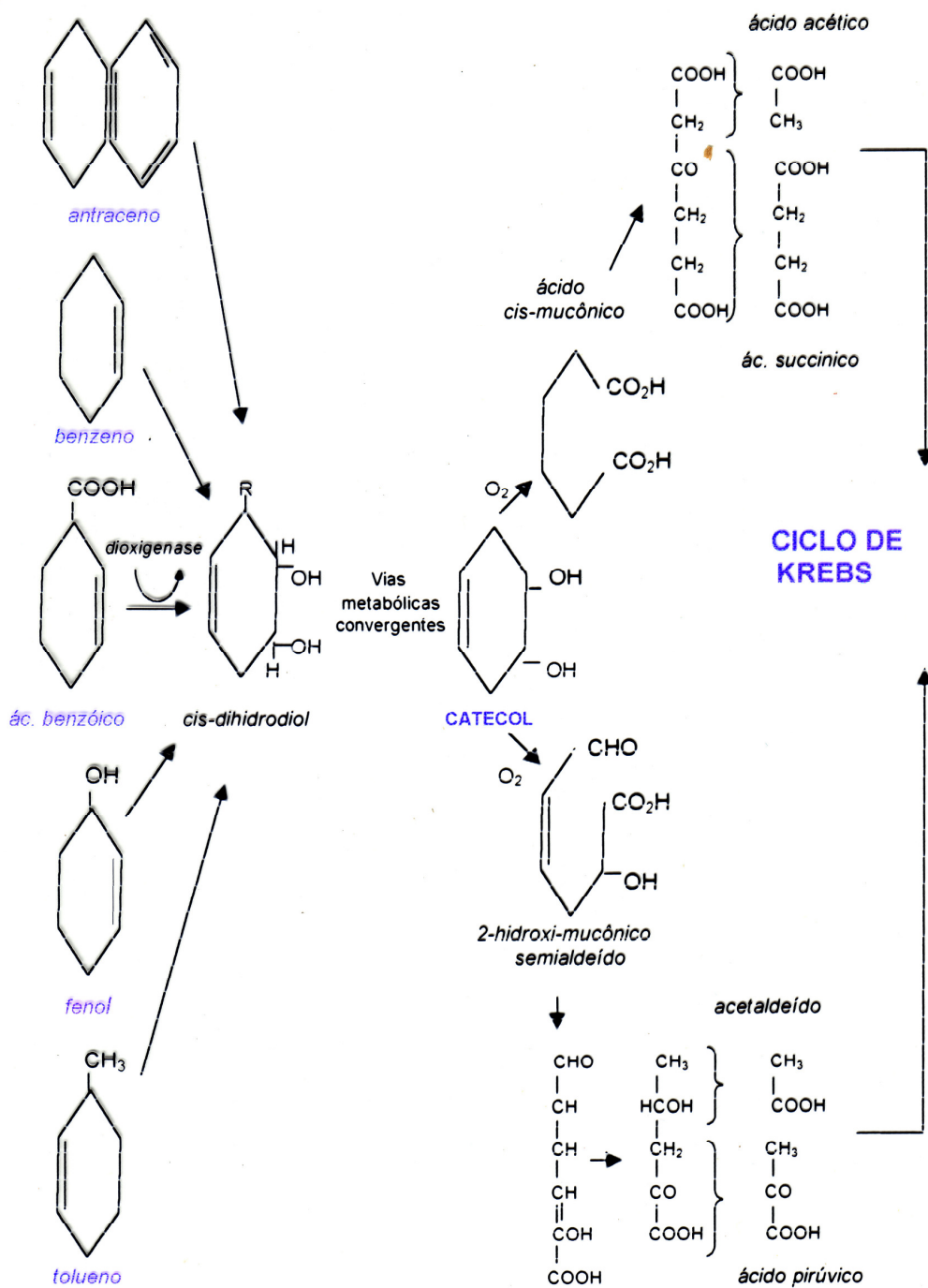


Figura 2. Etapas metabólicas básicas para degradação de hidrocarbonetos aromáticos (modificado de Schwartz e Leathen, 1976).

Uma provável rota para a biodegradação do biodiesel consiste primeiramente da hidrólise do metil ou etil éster por uma esterase (ou lipase), produzindo um ácido graxo e um álcool (Figura 3 –a). Na segunda etapa (Figura 3- b), os ácidos graxos são oxidados via β -oxidação e degradados a ácido acético e a um ácido graxo com dois carbonos a menos (Zhang *et al.*, 1998; Viera *et al.*, 2006). Nesta reação, primeiro, ocorre a conversão do ácido graxo a éster coenzima A (CoA). A seguir, o éster-CoA é oxidado na posição beta, e dois átomos de carbono do final da molécula são clivados para produzir a acetil-CoA. Este processo de encurtamento da molécula continua até o ácido inicial ser degradado completamente a acetil-CoA (Chapelle, 2001).

As esterases são enzimas que agem em ésteres solúveis ou hidrolisam outros lipídeos em água e as lipases são enzimas hidrolíticas que atuam na interface óleo/água catalisando as reações de hidrólise de triacilglicerídios, resultando na formação de mono e diacilglicerídios, ácidos graxos e glicerol, além disso, as lipases propiciam a quebra de emulsões de ésteres, glicerinas e ácidos graxos de cadeia longa. Ambas lipases e esterases são capazes de catalisar a hidrólise de ésteres, embora apenas as lipases atuem sobre ésteres insolúveis em água, como os triglicerídios. Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Jaeger *et al.*, 1999).

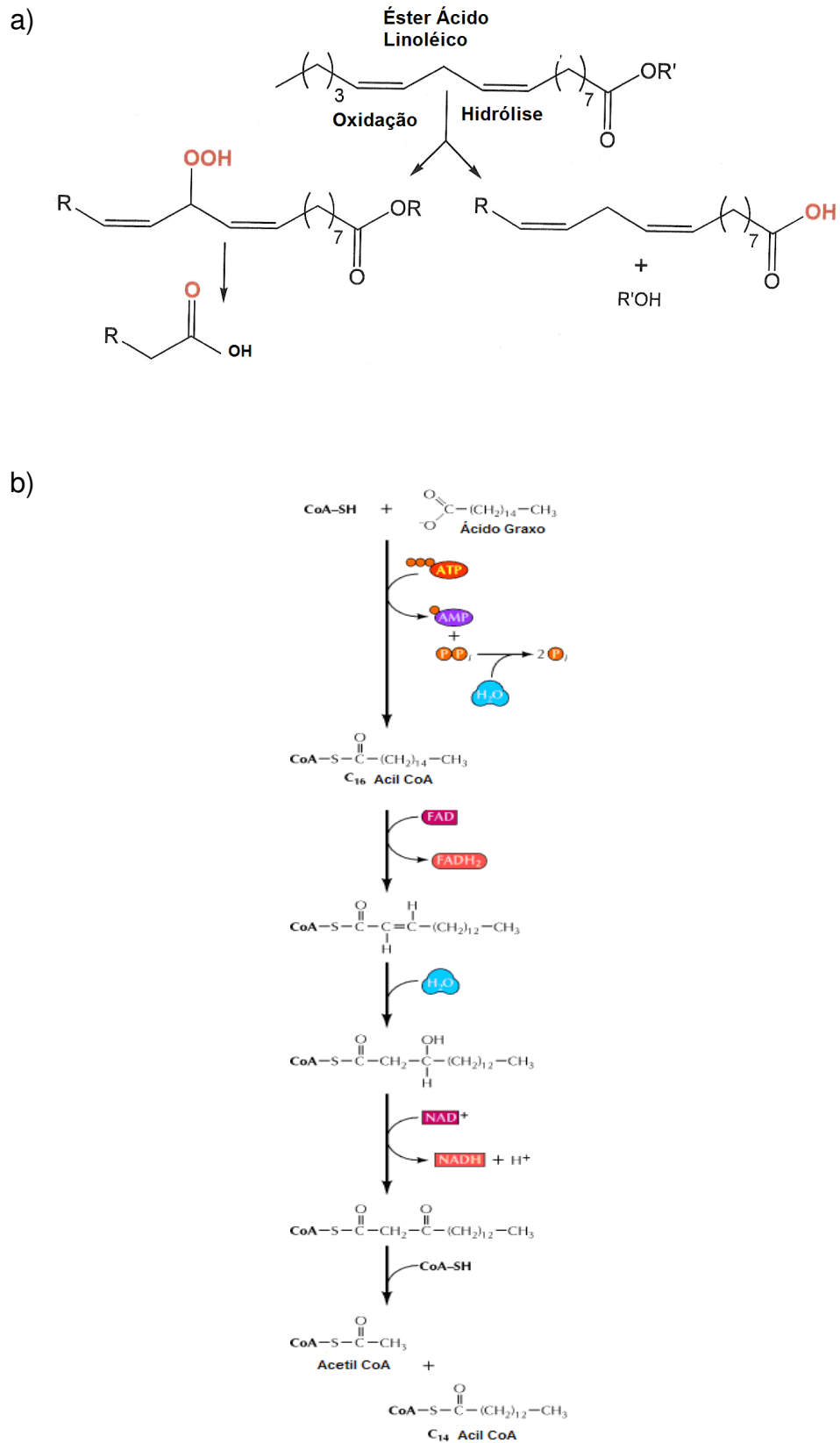


Figura 3. a) Hidrólise do éster ácido linoléico. b) Etapas da β -oxidação do palmitato. (Fonte: Cooper, 2000)

A nova formulação do combustível, que exige a adição do biodiesel ao diesel, pode influenciar, também, o processo de biodegradação. Estudos recentes vêm avaliando e comparando a degradação microbiana do biodiesel em relação às misturas de diesel e biodiesel e o diesel fóssil. DeMello *et al.* (2007), compararam a velocidade de degradação entre 100% de diesel fóssil e B25 (25% de biodiesel misturado ao diesel), em um ambiente marinho, e verificaram que a degradação dos ésteres de ácidos graxos e dos n - alcanos ocorre simultaneamente, e mais rapidamente do que outros componentes do diesel. Prince *et al.* (2008), em estudo sobre a biodegradação aeróbia da mistura binária B20, verificaram que metil-ésteres de ácidos graxos foram degradados a uma velocidade semelhante dos n-alcanos presentes no óleo diesel, novamente verificando uma relação entre a degradação dos ácidos graxos e a dos hidrocarbonetos.

Outros autores, como Pasqualino *et al.* (2006), relataram um aumento na biodegradabilidade das misturas de diesel e biodiesel, a medida que mais biodiesel era adicionado. Além disso, sugeriram um efeito positivo na biodegradação das misturas, ou seja, o biodiesel, ao ser adicionado no diesel, aumentou a biodegradabilidade do diesel, através do cometabolismo. As transformações cometabólicas são processos em que os microrganismos utilizam primeiramente um segundo substrato (mais acessível) como fonte de carbono, e, após irão utilizar o primeiro substrato (mais recalcitrante), que será atacado somente quando for a única fonte de carbono disponível (Zhang *et al.*, 1998). Em estudos sobre biodegradabilidade de biodiesel em ambientes aquáticos, Zhang *et al.* (1998), observaram o cometabolismo na biodegradação de misturas de diesel e biodiesel, na presença de ésteres de ácidos graxos, a

taxa de degradação do diesel aumentou três vezes, quando comparada a tratamentos, em que o diesel era a única fonte de carbono. Um aumento de 26% foi verificado na eficiência de biodegradação quando a fonte de carbono foi alterada, de diesel puro para biodiesel puro, por Owsianiak *et al.* (2009). Schleicher *et al.* (2009) verificaram um maior crescimento de microrganismos em misturas com 20% de biodiesel de soja, e 80% de diesel (B20), seguido pela mistura B5, e então por B100.

Segundo Mehdi & Giti (2007), a velocidade de biodegradação depende da concentração e da composição do óleo, do tipo de microrganismos presentes e de um grupo de moléculas, denominadas biossurfactantes. De acordo com Desai & Banat (1997), os biossurfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é frequentemente uma cadeia carbonada enquanto a porção polar pode ser iônica, não iônica ou anfotérica. Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana que exibem propriedades de surfactantes, isto é diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (Nitschke & Pastore, 2002). Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial e interfacial, tensão que existe entre dois líquidos imiscíveis, porque se acumulam na interface destes fluídos imiscíveis ou entre um sólido e um fluído. Dessa forma os biossurfactantes aumentam a área de contato destes compostos insolúveis, proporcionando maior mobilidade, biodisponibilidade e conseqüentemente biodegradação (Banat *et al.*, 2000; Mulligan, 2005, Bento *et al.*, 2008).

Além disso, os biossurfactantes podem apresentar atividade emulsificante, essa capacidade de emulsificação pode ser visualizada durante o crescimento dos microrganismos em meio mínimo (meio mineral), através de macro ou microemulsões formadas na fonte insolúvel de carbono, comparando-se sem o controle, sem microrganismos (Bento *et al.*, 2008). Estes bioemulsificantes são surfactantes de alto peso molecular, e são responsáveis pela formação e estabilidade da emulsão, porém, não causam necessariamente a redução da tensão superficial (Bento *et al.*, 2008).

Os biossurfactantes afetam a velocidade de biodegradação de duas formas: (i) aumentando a dissolução das moléculas na fase aquosa e (ii) modificando a afinidade entre as células microbianas e os hidrocarbonetos, ao aumentar a hidrofobicidade da superfície celular (Luis *et al.*, 2000; Mehdi & Giti, 2008; Paria, 2008). Os biossurfactantes estão envolvidos na formação de biofilmes na interface óleo/ água, ocorrendo, inicialmente, com a aderência dos microrganismos à superfície de grandes gotas de óleo, assim, a produção do biossurfactante nesta camada que reveste a gota, a tensão interfacial é reduzida para o crescimento dos microrganismos (Singh *et al.*, 2007). Os biossurfactantes têm sido frequentemente citados como um mecanismo pelo qual os microrganismos aumentam seu acesso a substratos pouco solúveis transportando, tanto passivamente como ativamente, o composto apolar para o interior da célula (Van Hamme *et al.*, 2006, Bento *et al.*, 2008). De acordo com a literatura os microrganismos capazes de reduzir a tensão superficial de $72,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (medida de tensão superficial da água) para a faixa de $35,0\text{mN}/\text{m}$ a $40,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, podem ser considerados bons produtores de biossurfactantes, e

abaixo de $35,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, indica que o microorganismo pode ser considerado um eficiente produtor (Silva, 2002).

2.4 Conseqüências da contaminação microbiana durante o armazenamento de combustíveis

Na maioria dos casos, os problemas relativos a contaminação microbiana especialmente no combustível diesel, somente são investigados quando começam a ocorrer danos nos equipamentos ou problemas com a corrosão dos tanques. Os custos geralmente são altos para a desativação e recuperação de tanques armazenadores danificados pela corrosão. A biodeterioração do diesel é caracterizada pelas alterações nas propriedades químicas (degradação das cadeias hidrocarbônicas) e físicas, como a produção de sólidos visíveis (Bento, 2001).

As conseqüências mais relevantes da biomassa microbiana formada na interface óleo-água são: obstrução de filtros, tubulações, mangueiras; aumento do conteúdo de água no sistema; a atividade bacteriana gera produtos poliméricos extracelulares, que se incorporam à biomassa interfacial do sistema, a produção de biossurfactantes que causa a emulsão do hidrocarboneto na água, e a migração da biomassa microbiana para a fase oleosa. Muitas vezes, dependendo do grau de contaminação do tanque, pode-se observar o escurecimento da água presente no fundo dos tanques armazenadores, pela precipitação do sulfeto de ferro, e com cheiro característico de ácido sulfídrico, devido à atividade de bactérias anaeróbias reductoras de sulfato (Passmann, 2003).

A atividade microbiana no combustível contribui para o aumento da instabilidade química dos hidrocarbonetos, acelerando reações que produzem

mais sedimentos de origem química (gomas). As consequências de um combustível contaminado repercutem no funcionamento dos veículos, comprometendo o rendimento dos motores (saturação de filtros, desgaste de bicos injetores) (Passmann, 2003; Bento, 2001). O combustível no tanque é aspirado pela bomba alimentadora, e levado aos filtros onde se processa uma filtragem mais fina. Em seguida, chega à bomba injetora que faz a distribuição aos bicos injetores. Além de ser combustível o óleo diesel também exerce a função de lubrificar e resfriar partes da bomba injetora, retornando ao tanque com uma temperatura aproximada de 60°C. Neste momento, o tanque exerce a função de dissipador de calor deste combustível. Se o combustível estiver contaminado com sólidos suspensos, ocorrerá o desgaste principalmente de bicos injetores, e com o desgaste ocorrerá um desequilíbrio no processo de alimentação do motor, ocasionando uma combustão incompleta do combustível. Como consequência forma-se fuligem, que por ser abrasiva, acelera o desgaste das peças do motor, abreviando sua vida útil. Além disso, aumenta o consumo de combustível e promove poluição (fumaça negra) (Rogers & Kaplan, 1982; Hartman *et al.*, 1988; Reddy, 1988; Carta, 1994; Bento, 2001).

2.5 Controle do desenvolvimento de populações microbianas em combustíveis

A contaminação de tanques de armazenamento por uma população microbiana, e seu conseqüente desenvolvimento, compromete a qualidade final do combustível, assim, medidas devem ser adotadas para evitar a contaminação. Os tanques de armazenamento que apresentam contaminação microbiana são identificados pela presença de uma fase aquosa e uma fase

oleosa, cujo monitoramento deve ser feito de forma específica e separadamente (Bento, 2001). Na presença das duas fases, deve-se inspecionar a interface óleo - água, a fim de se detectar a presença de sedimentos, indicativa do crescimento microbiano nesta região. Para evitar o desenvolvimento de populações microbianas deteriogênicas no combustível são indicados procedimentos físicos e químicos, garantindo assim, a qualidade final do produto durante o armazenamento.

A água é o principal fator que desencadeia o crescimento de microrganismos deteriogênicos. Dessa forma, como medida preventiva, a drenagem da fase aquosa - também denominada água de lastro - é considerada eficiente (Gaylarde *et al.*, 1999; Chesneau, 2000; Bento, 2001; Passmann, 2003). No entanto, o formato do tanque pode dificultar uma drenagem completa, impedindo que toda água do lastro seja removida (Westbrook, 1998). Além disso, é necessário dificultar que a infecção microbiana se difunda de um tanque contaminado para um tanque sem contaminação, através da transferência do combustível contaminado por mangueiras, ou filtros, que tenham sido utilizados para um combustível contaminado. Os procedimentos de limpeza e drenagens regulares são medidas físicas que impedem o acúmulo da água formada nos lastros, constituem se em uma forma estratégica no controle da infecção microbiana, assim como o monitoramento microbiológico para a determinação dos microrganismos viáveis presentes no combustível armazenado (Gaylarde *et al.*, 1999; Chesneau, 2000; Passmann, 2003).

O controle do desenvolvimento de populações deteriogênicas pode ser feito através da aplicação de agentes antimicrobianos (biocidas), reduzindo

ou eliminando o desenvolvimento de contaminantes microbiológicos. Sua aplicação tem sido proposta como um dos métodos mais eficientes no controle da suscetibilidade à deterioração dos combustíveis (Gaylarde *et al.*, 1999; Chesneau, 2000; Bento & Gaylarde, 2001, Gonçalves *et al.*, 2002; Passmann, 2005).

Os biocidas compreendem produtos com largo espectro de componentes de estruturas químicas (compostos inorgânicos e orgânicos), utilizados para desinfetar, ou esterilizar objetos e superfícies, e preservar materiais ou processos da degradação microbiana (Gaylarde, 1995; Chapman, 2003; Moragas & Schneider, 2003; Zaporali, 2005). O caráter químico dos biocidas permite que sejam classificados em duas categorias: oxidantes (ozônio, peróxido de hidrogênio, compostos clorados) e, não oxidantes (compostos sulfurados, estanhados, isotiazolonas, sais de cobre, entre outros). Embora apresentem diferenças químicas importantes, o modo primário de ação dos biocidas oxidantes consiste em oxidar compostos constituintes das células microbianas, sendo conseqüentemente efetivos contra quase todos os tipos de microrganismos. Os biocidas não-oxidantes, que englobam uma enorme variedade de compostos orgânicos, exercem atividade antimicrobiana atuando sobre os microrganismos por interferência em seu metabolismo e/ou pela desintegração da parede celular, geralmente são inibidores enzimáticos ou desnaturam proteínas (Gaylarde, 1995; Russel, 2003). Assim, dependendo de suas características, o modo de ação do biocida pode ser classificado em três tipos: quando envolvem interação com as estruturas celulares externas, como a parede celular; interação com componentes da membrana plasmática, ou interação com as estruturas citoplasmáticas (Yemanshova *et al.*, 2007).

O produto comercial Kathon®FP 1.5 (EPA Número de Registro: 00070700198) tem como ingredientes ativos 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-4-ona (1.15%) e 2-metil-4 isotiazolin-4-ona (0.45%) e compostos inertes como dipropileno glicol (88-90%); água (5-6%) e sais de magnésio (nitrato de magnésio 1,7-1,8 % ; cloreto de magnésio 0,9-1,0 %). O produto é utilizado no tratamento curativo, quando o sistema está contaminado, ou para a manutenção (tratamento preventivo) e devido ao seu coeficiente de partição, grande parte fica na fase aquosa e pequena parte no combustível. A dosagem curativa indicada é de 150 a 300ppm do produto (respectivamente 1,18 ppm e 2,35ppm, de ingrediente ativo), e a preventiva de 100 a 150 ppm do produto (respectivamente 0,78 ppm e 1,18 ppm de ingrediente ativo). Atua sobre os microrganismos entre 12 e 24 horas após ser aplicado ao combustível.

O modo de ação dos biocidas utilizados está relacionado a diferentes estruturas das células dos microrganismos. No caso da isotiazolona, inicialmente o produto exerce uma ação biostática, com a penetração na membrana celular e inibição em sítios específicos de enzimas na célula. Algumas dessas enzimas fazem parte do ciclo de Krebs (Figura 4). Este biocida age sobre quatro diferentes sítios no ciclo de Krebs: a enzima piruvato desidrogenase, a alfa-cetoglutarato desidrogenase, o succinato desidrogenase e o NADH desidrogenase. O funcionamento adequado do ciclo de Krebs é essencial para o fornecimento energético e precursor de inúmeras vias metabólicas celulares. Desta forma, as células inibidas pelo biocida perdem rapidamente a habilidade de produzir energia (medida pela síntese de ATP) e a síntese de componentes celulares. Outra forma de atuação do biocida, pode

ser medida, pela perda do grupo tiol (S-H) de algumas proteínas, importantes na manutenção da estrutura e funcionamento celular.

Para a desativação do biocida na fase aquosa de tanques de estocagem é recomendada a adição de meta-bissulfito de sódio ou uma solução de bissulfito de sódio, cuja reação com as isotiazolonas acarreta na sua degradação em componentes não tóxicos ao ambiente.

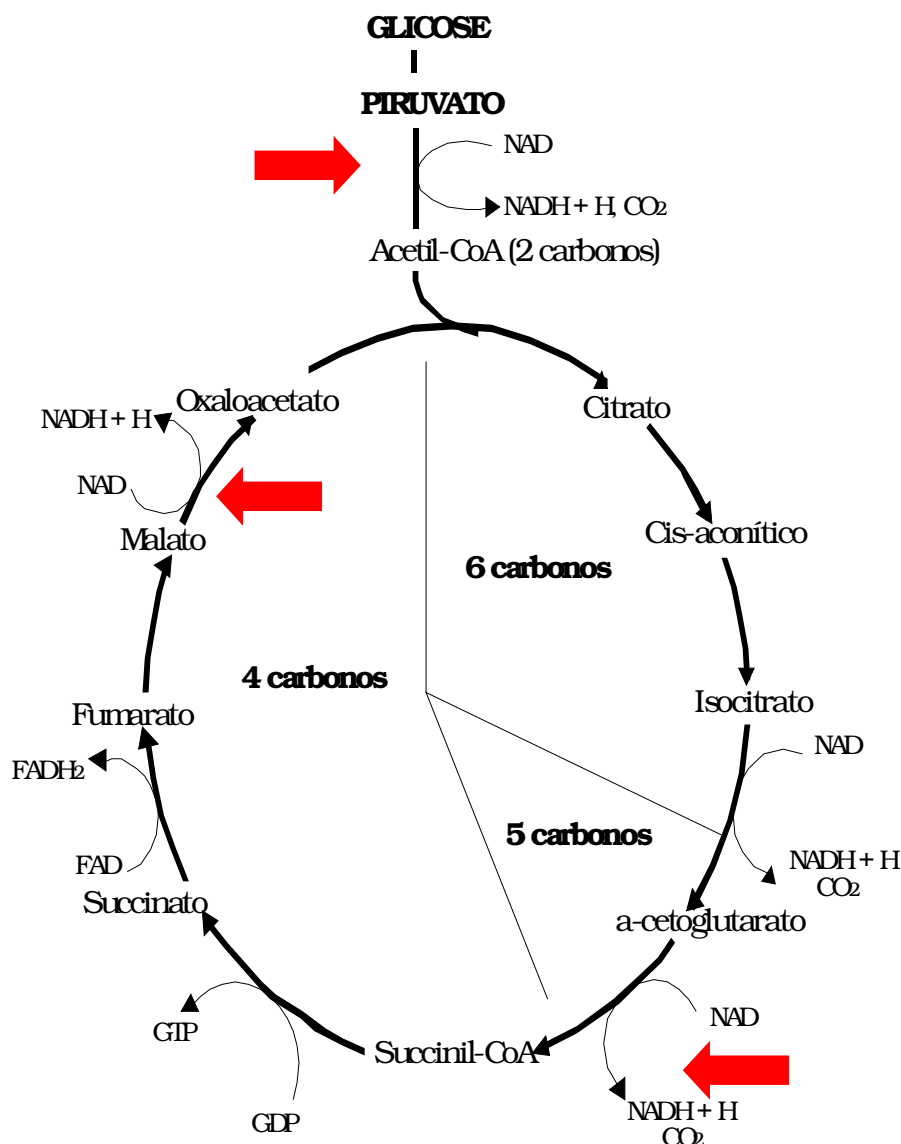


Figura 4. Sítios específicos de inibição do biocida isotiazolona no Ciclo de Krebs.

O Bakzid® é uma mistura de oxazolidinas específicas (4,4-methylene-bis(5-methyl-oxazolidine) e isotiazolinonas, que oferece proteção à contaminação microbiana tanto na fase aquosa como na fase oleosa, sendo indicado para uso em óleo diesel e biodiesel. De acordo com informe técnico do produto são sugeridas duas dosagens, a 100 ppm para uso preventivo e a de 1000 ppm para a dosagem de impacto em sistemas já contaminados.

Oxazolidinas são uma importante classe de compostos heterocíclicos, que apresentam boas propriedades antimicrobianas, sendo muito utilizados na indústria farmacêutica (Zhang *et al.*, 2005). A ação de biocidas com o princípio ativo baseado em oxazolidinas está relacionada a inibição da síntese de proteínas. Wilson & Nierhaus (2007) identificaram a orientação de antimicrobiana a base de oxazolidina no centro peptidiltransferase de ribossomos mitocondriais e bacterianos, indicando o mecanismo de ação desta droga.

O biocida Biobor JF (EPA Número de Registro: 012403), cuja composição do ingrediente ativo é de 67,6% de 2,2'(1-methyltrimethylenedioxy)bis-(4-methyl-1,3,2-dioxaborinane) e 27,4% de 2,2'-oxybis(4,4,6-trimethyl-1,3,2-dioxaborinane) apresenta 4,5% nafta de petróleo e 0,5% de produtos inertes e é indicado, comercialmente, para preservar combustíveis derivados do petróleo como o diesel, os combustíveis utilizados na aviação (querosene), entre outros. Sua aplicação é indicada no controle do desenvolvimento de microrganismos nestes combustíveis, tanto de bactérias quanto de fungos, enquanto são armazenados, transportados ou utilizados. Sua composição permite que a ação seja sobre o combustível, e também sobre uma fase aquosa (denominada água de lastro) caso esteja presente. Em

sistemas contaminados é indicado o uso de 270 ppm do produto, para eliminar a população microbiana presente, e para evitar a contaminação, indica-se o uso de 135ppm do produto, respectivamente, 20 e 10 ppm de ingrediente ativo. O tempo de ação, após ser aplicado, é estimado entre 36 e 72 horas.

O composto dimetildiotiocarbamato é a composição do ingrediente ativo do biocida comercial West Marine (EPA Número de Registro: 60061-94). É indicado como agente biocida para preservação de óleos. O mecanismo de ação deste composto está associado a inibição de enzimas do ciclo de Krebs.

As exigências para um biocida de uso industrial, ou para uso em sistemas de armazenamento de combustíveis, incluem: seletividade com os microrganismos a eliminar; capacidade de manter o seu efeito inibidor em presença de outras substâncias no meio, em condições de operação semelhantes; não ser corrosivo ao sistema; apresentar propriedades de biodegradabilidade; e, ter baixo custo (Gaylarde, 1995; Gaylarde *et al.*, 1999; Passmann, 2000; Chelossi & Faimali, 2006; Yemashova *et al.*, 2007). Além disso, uma das exigências de um biocida ideal, para tanques de armazenamento, é em relação ao coeficiente de partição, pois apresenta um papel importante em dois aspectos, velocidade de efetividade e tempo de preservação. O coeficiente de partição de um biocida descreve a afinidade que o biocida tem pela fase combustível ou pela fase água. Um biocida que tem alto coeficiente de partição pode favorecer a fase combustível mais do que a fase aquosa e o de baixo coeficiente de partição (maior afinidade pela água), pode atuar mais na fase aquosa que no combustível (Dorris & Pitcher, 1988).

Com relação ao procedimento de aplicação pode-se citar o tratamento contínuo (mais freqüente, com concentrações baixas) e o

tratamento de choque (com concentrações altas) pouco freqüente, aplicados a intervalos pré-determinados (Bento & Gaylarde, 2001; Gonçalves *et al.*, 2006), Para garantir eficácia do biocida, é necessário conhecer a população alvo a ser eliminada depende e as condições de operação do sistema a tratar. Recomenda-se um ensaio prévio, preferencialmente nas condições reais de operação, ou em laboratório, com a determinação de concentração ótima, assim como da natureza do componente ativo mais apropriado. Os biocidas podem ser aplicados em concentrações maiores do que aquelas obtidas em testes de concentração mínima inibitória (CMI) ou testes de concentração mínima biocida (CMB), representando situações não aplicáveis às condições reais (White & McDermott, 2001). A CMI é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo nos teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo, e a concentração mínima biocida (CMB), definida como a menor concentração de um agente microbiano que capaz de causar a morte dos microrganismos selecionados (ANVISA, 2002; Cury *et al.*, 2007). Ao determinar a concentração em que se observou a CMI, se pode inferir que a aplicação do biocida nessa concentração atuou de forma biostática/ esporistática. Ao se determinar a CMB, tem-se a informação sobre concentração que é capaz de se ter a atividade biocida/esporicida sobre o microrganismo da substância antimicrobiana avaliada. A determinação da CMI e da CMB é realizada em condições ótimas de cultivo, e informa sobre possíveis faixas de inibição e de morte dos microrganismos. Segundo Scott (2000), uma das falhas que podem ocorrer em programas de monitoramento da biocorrosão em tanques de armazenamento é a medida incorreta de uso dos biocidas. Geralmente, são adicionados no sistema automaticamente, conforme

rotinas programadas, segundo dosagens informadas pelo fabricante. Entretanto, poucos são os detalhes sobre a quantidade de biocida efetivo recebido, ou uma medida de seu efeito residual no sistema. Outro aspecto a ser considerado, é a falha em correlacionar as doses de biocida com contagens microbianas e taxas de corrosão. Os números microbianos no sistema devem ser analisados antes, durante e por períodos freqüentes depois da ação do biocida (Bento, 2001).

O controle da efetividade do biocida é algo que deve ser levado em consideração, uma vez que os biocidas podem ser degradados por fatores químicos e físicos, como temperatura, pH, ou efeitos biológicos, como a atividade de enzimas, e a adsorção celular em superfícies (biofilmes). Estes fatores podem resultar em um tratamento ineficiente do local contaminado. No entanto, quando a inativação não ocorre, e mesmo assim o biocida não é efetivo na erradicação dos microrganismos, o que pode estar em questão é a presença de microrganismos com mecanismo de resistência presentes no sistema (Gaylarde, 1995; Chapman, 2003; Russel, 2003).

Os biocidas não fazem parte das substâncias que são adicionadas ao combustível, no entanto, um biocida pode ser utilizado no tratamento se combustíveis armazenados, sendo uma prática indicada nos EUA, onde foram aprovadas listas com microbicidas pela Agência Nacional Americana para uso no combustível. Entre os princípios ativos de tais microbicidas tem-se listado em Manual ASTM-47 (Passmann, 2003) isotiazolonas, dioxiborinanas, ditiocarbamatos e gluataraldeídos, oxazolidinas entre outros (Gaylarde, 1995; Bento & Gaylarde, 2001). Atualmente, não são utilizados produtos com propriedades biocidas junto aos aditivos para combustíveis no país (Brasil),

nem mesmo quando tanques de armazenamento apresentam contaminação microbiana, embora estudos já tenham sido realizados utilizando um dos biocidas disponíveis para combustíveis no mercado. Um produto, cujo ingrediente ativo é uma mistura de duas isotiazolonas foi testado e apresentou alta efetividade no controle do crescimento de *Aspergillus fumigatus*, *Hormoconis resinae*, *Rhodotorula glutinis* e *Candida silvicola* em baixas concentrações (Bento & Gaylarde, 2001). Bento & Gaylarde (1996) testaram quatro biocidas solúveis em água e sua atividade sistemas óleo/água contra bactéria e fungos isolados de tanques de estocagem, e verificaram que uma mistura de isotiazolonas e de quaternário de amônia foram os mais efetivos. Em estudo sobre armazenamento de óleo bruto de dendê, Santos *et al.* (2007) verificaram a eficiência de aplicar uma resina biocida a 2-vinilpirimidina impregnada com iodo para controlar o crescimento de *Paecilomyces variotii* nos tambores de estocagem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Crescimento microbiano em misturas de diesel e biodiesel

3.1.1 Microrganismos

Foram utilizados os fungos filamentosos e leveduriformes: *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces* sp., *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. O fungo filamentoso *A. fumigatus* e a levedura *C. silvicola*, foram previamente isolados através de filtração de óleo diesel de tanques armazenadores e identificados por Bento (2001). Os fungos *Paecilomyces* sp. e *Rhodotorula* sp. foram isolados através da filtração de amostras de biodiesel de soja, como descrito por Bento & Gaylarde (1996). O fungo filamentoso *Paecilomyces* sp. foi identificado com base nos estudos morfológicos analisados em microcultivo, de acordo com Barnett (1960). A identificação da levedura *Rhodotorula* sp. Foi realizada seguindo características morfológicas e fisiológicas segundo Barnett *et al.* (2000).

3.1.2 Combustíveis

Os combustíveis utilizados nos experimentos foram fornecidos pela Companhia Brasileira de Petróleo Ipiranga. Foram utilizados óleo diesel e biodiesel produzido a partir de soja. Utilizaram-se as misturas com 5, 10, 20 % de biodiesel ao diesel (denominadas B5, B10 e B20, respectivamente), somente biodiesel (B100) e somente diesel (B0). As misturas de diesel e biodiesel (B5, B10 e B20) foram preparadas no laboratório utilizando-se uma

proveta graduada, previamente desinfetada. A esterilização do combustível (do diesel, do biodiesel e das misturas) foi realizada utilizando-se um frasco Kitassato esterilizado e um filtro com membranas de porosidade 0,22 µm (Millipore). O combustível filtrado foi armazenado em frascos de vidro previamente esterilizados, em autoclave por 15 min, a 121°C, a 1 atm. Após a esterilização, o combustível foi acondicionado nos frascos, que foram recobertos com papel alumínio para evitar a foto-oxidação do combustível, por uma semana.

3.1.3 Condições de cultivo para crescimento microbiano

Os experimentos envolvendo o crescimento dos fungos filamentosos, utilizando diesel/biodiesel como fonte de carbono e energia, foram conduzidos em frascos de vidro, previamente esterilizados, com capacidade para 150mL, utilizando-se uma fase aquosa e uma fase oleosa, como pode ser visualizada na Figura 5. A fase aquosa (meio mineral) foi confeccionada conforme Richard & Vogel (1999), e é composta por nutrientes minerais simulando a condição de água de lastro presente nos tanques, com o objetivo de acelerar o crescimento dos microrganismos deteriorogênicos do combustível. O meio mineral, cuja composição é apresentada no Anexo 9.1.1, foi esterilizado em autoclave nos frascos experimentais, a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos. Após a esterilização da fase aquosa, nos frascos, adicionou-se a fase oleosa nestes frascos, na proporção de 1:1 (25 mL de fase aquosa e 25 mL de fase oleosa). A fase oleosa foi constituída por diesel (B0), biodiesel (B100), ou pelas misturas de diesel/biodiesel (B5, B10, B20), esterilizadas, como descrito anteriormente. Os frascos foram recobertos com papel alumínio para evitar a

foto-oxidação do combustível. O experimento foi realizado em quintuplicata, montado com repetições destrutivas.

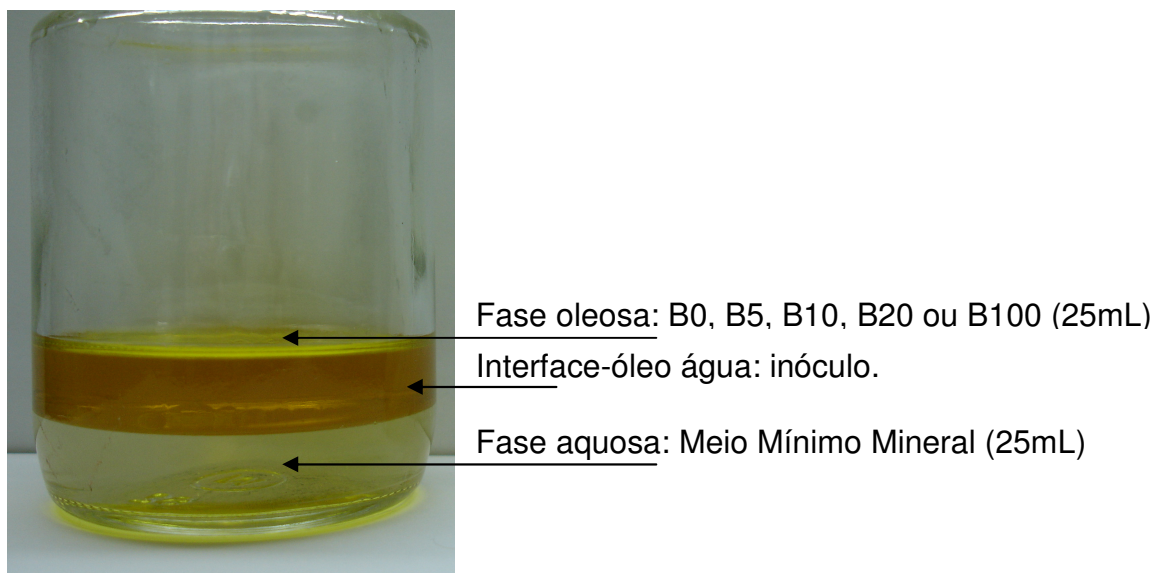


Figura 5: Frasco experimental (150 mL), contendo a fase aquosa e a fase oleosa do ensaio, na proporção de 1:1 v/v. Fonte Francielle Bucker.

Os experimentos envolvendo o crescimento dos fungos leveduriformes, utilizando diesel/biodiesel como fonte de carbono e energia, foram conduzidos em erlenmeyrs com capacidade para 250 mL, aos quais foi adicionada uma fase aquosa 160 mL, com meio mineral M1. Os frascos de cultivo foram então esterilizados a 121°C, durante 15 min, a 1 atm, em autoclave. Aos frascos, com o meio mineral M1 já esterilizado, foi adicionada a fase oleosa na proporção de 1% v/v. O combustível utilizado (B20 e B100) foi esterilizado como descrito anteriormente. Os frascos experimentais foram recobertos com papel alumínio para evitar a foto-oxidação do combustível. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.4 Fase aquosa

A fase aquosa dos experimentos de curva de crescimento foi avaliada quanto a presença de substâncias emulsificantes, tensoativas, e de metabólitos com características ácidas ou básicas. Estas análises foram avaliadas durante todo o experimento, nos tempos estabelecidos de cultivo para cada microrganismo.

A detecção da produção de biossurfactantes foi realizada pela medida do índice de emulsificação e medida da tensão superficial a partir da fase aquosa do experimento, no início e no final do ensaio da curva de crescimento. Para a avaliação do índice de emulsificação, 2 mL do meio de cultura foram misturados a 2 mL de diesel em um tubo de ensaio com fundo reto. A mistura foi agitada em vortex por dois minutos e os frascos foram deixados em repouso por 24 horas, após foi calculado a altura da emulsão (camada entre a fase aquosa e o hidrocarboneto) dividido pela altura total dos 4mL e multiplicado por 100. Desta forma, foi obtido o IE 24(%) (índice de emulsificação) no hidrocarboneto (Bento *et al.*, 2008).

A medida de tensão superficial foi avaliada na ausência de biomassa. A fase aquosa foi submetida a centrifugação, a 10.000 rpm por 15 minutos, para remoção de quaisquer células presentes. As amostras permaneceram por 30 minutos a temperatura ambiente e a medida de tensão superficial foi determinada em um medidor de tensão superficial digital (Gibertini, Milão, Itália), utilizando-se o método da placa de Wilhelmy. Para a medida de tensão superficial foi utilizado cerca de 10mL de fase aquosa. Para a calibração do aparelho utilizou-se como padrões líquidos a água destilada ($72,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) e etanol ($24,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

A detecção da produção de metabólitos ácidos foi realizada através de medidas de pH, que foram determinadas a temperatura ambiente com auxílio de um pHmetro digital. As medidas de pH foram conduzidas nos tempos experimentais previamente definidos.

3.1.5 Fase oleosa

A fase oleosa foi avaliada quanto a degradação das cadeias de ésteres de ácidos ação dos microrganismos, a partir das amostras de biodiesel (B100) utilizado nos ensaios de crescimento com os microrganismos *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces* sp., *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. isolados.

Os resultados foram apresentados na forma de percentual de degradação para cada pico, pela comparação da área dos picos apresentados pelo controle (Anexo 9.4).

Para a obtenção dos cromatogramas foi realizado uma injeção com amostras do tratamento com B100 e depois com o óleo diesel submetido as mesmas condições de incubação (Controle), que os demais ensaios, ou seja, em contato com a fase aquosa M1 na temperatura de 28°C.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo de fase gasosa acoplado com detector seletivo de massa, que é utilizado para determinar o teor de éster e ácido linolênico metil éster presentes nas amostras de biodiesel pelas condições determinadas por European Standard Method EN 14103, regulamentado pela RESOLUÇÃO ANP Nº 42, DE 24.11.2004 - DOU 9.12.2004 – retificada DOU 19.4.2005. As condições da diluição da amostra foram as seguintes: 20 µL em 1mL de diclorometano. O volume de injeção foi de 1.0µL. O tipo do detector utilizado foi um Seletivo de Massa, com modo de

varredura de 35 a 450 u.m.a (unidades de massa atômica). A coluna utilizada foi: SGE BP X5 25 mx 0,2 mm, 0,25 μ m de espessura do filme, ligado a uma fase capilar. A temperatura do injetor foi de 250° C. O forno foi programado a temperatura inicial de 60°C, por 3 minutos e subsequente aquecimento na taxa de 7 °C/min até atingir a temperatura final de \ 280°, com tempo de residência de 10 min nesta temperatura. A temperatura do detector foi ajustada em 280 °C. A taxa de fluxo do gás: portador hélio, 1 mL.min⁻¹. E a duração de cada ensaio: aproximadamente 40 minutos. Como padrão interno utilizou-se heptadecanoato de metila.

3.1.6 Curvas de crescimento de fungos filamentosos em misturas de diesel e biodiesel

A avaliação do crescimento dos fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces* sp. foi realizada nas condições descritas na seção 3.1.3. O inóculo padronizado, descrito a seguir, foi adicionado a cada frasco de cultivo, de modo a se obter uma concentração inicial de 10⁷ esporos mL⁻¹, exceto nos frascos controle (em que não se adicionou o inóculo). O experimento foi incubado em estufa, a 28 ° C. As amostras foram retiradas em batelada, nos seguintes tempos 7, 14, 21, 28 dias, 42 e 60 dias.

A padronização do inóculo foi realizada a partir de culturas com 7 dias, cultivadas em ágar malte (Anexo 9.1.2) em tubo inclinado, mediante a adição de água destilada estéril e 2mL de surfactante, o Tween 80, preparado na concentração de 0,01%. O uso do surfactante teve como objetivo facilitar a dispersão dos esporos, uma vez que apresentam propriedades adstringentes. Utilizou-se 1mL da suspensão em cada frasco do cultivo do experimento, em

que, por contagem em câmara de Neubauer, obteve-se uma concentração final com 10^7 esporos mL^{-1} .

Na fase aquosa avaliou-se o pH, presença de metabólitos e de substâncias surfactantes. O crescimento foi avaliado através da biomassa formada na interface óleo-água. A fase oleosa destes dois ensaios foi avaliada para se verificar a degradação de ésteres do tratamento B100. A fase oleosa de cada frasco de cultivo foi transferida para um funil de separação, previamente desinfetado, utilizado para a separação de líquidos não miscíveis, ou seja, para a separação da fase aquosa e da fase oleosa. A biomassa fúngica foi quantificada através da técnica peso seco (Anexo 9.2). Após a separação das fases aquosa e oleosa de cada frasco, com o auxílio de um funil de separação, a biomassa formada foi retida em discos de papel filtro, previamente pesados. Para a remoção do excesso de óleo, utilizou-se 4mL de hexano, sobre cada disco. Os discos foram colocados em estufa a 50°C , durante 4 dias, para remoção da umidade e da estufa transferidos diretamente para um dessecador, de onde foram retirados, somente para a pesagem.

3.1.7 Curvas de crescimento de fungos leveduriformes em misturas de diesel e biodiesel

Foi avaliado o crescimento das leveduras *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. na mistura de diesel e biodiesel B5. A avaliação do crescimento, nesta mistura foi por sua composição ser a mais próxima a da mistura utilizada na matriz energética do país (B3). Além da capacidade de crescimento nesta mistura, a avaliação preliminar foi conduzida para selecionar a proporção de óleo que seria utilizada nas condições de cultivo da curva de crescimento das leveduras. Esta avaliação foi feita utilizando-se um teste

colorimétrico, utilizando o indicador redox TTC (cloreto de tetrazolium violeta) de acordo com Braddock & Catterall (1999), substituindo-se o meio mineral Busnhell – Hass pelo Meio Mínimo Mineral (M1) (Anexo 9.1.1). A medida da atividade de uma ou mais enzimas da cadeia respiratória, pode ser utilizada como índice da atividade oxidativa total da célula. Um dos métodos, mais utilizados para estimar a atividade da enzima desidrogenase no solo, é baseado no uso do indicador redox cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), como um acceptor final de elétrons, que é reduzido para trifenil formazan (TPF) (Braddock & Catterall, 1999). O indicador redox TTC é adicionado ao meio mineral e a interpretação do teste foi realizada pela observação da mudança de cor do meio incolor para róseo. Isso indica que o TTC foi utilizado como acceptor artificial de elétrons, informando sobre a oxidação dos combustíveis pelos microrganismos testados. Em tubos de ensaio foi adicionada uma fase aquosa, meio mineral com TTC e uma fase oleosa de diesel com biodiesel (B5), nas seguintes proporções: 1%, 0,5%, 0,25%, 0,1% e 0,01%. Após a adição das fases aquosa e oleosa nos tubos foi realizada a inoculação com um inóculo padronizado (descrito a seguir) com *Candida silvicola* ou com *Rhodotorula* sp, para a avaliação do crescimento. Durante a incubação dos tubos de ensaio, a 28°C, sob 120 rpm de agitação, foi observada em qual proporção (1%, 0,5%, 0,25%, 0,1% ou 0,01%), ocorreu em menor tempo, redução do TTC a TPF.

Após definir a proporção (1%, 0,5%, 0,25%, 0,1% ou 0,01%) de fase oleosa, em relação a fase aquosa, determinaram-se duas composições de combustível (B0, B5, B10, B20 ou B100), que seriam utilizadas para realizar a curva de crescimento de *Candida silvicola* e de *Rhodotorula* sp., nas condições de cultivo citadas no item 3.1.3. Em frascos de vidro, previamente esterilizados,

em autoclave a 121°C, por 15 minutos, meio mineral M1 com TTC, e uma fase oleosa (B0, B5, B10, B20 ou B100) na proporção obtida na etapa descrita anteriormente. Após a adição das fases aquosa e oleosa nos frascos foi realizada a inoculação com um inóculo padronizado (descrito a seguir) com *Candida silvicola* ou com *Rhodotorula* sp. Os frascos foram incubados a 28° C, sob agitação de 120 rpm. A avaliação, novamente consistiu na observação visual da mudança de cor do meio de incolor para róseo, devido a ocorrência da redução do TTC a TFP, diante do crescimento da levedura no meio. Dessa forma, as duas misturas que apresentaram em menor tempo essa mudança de cor foram as selecionadas para a curva de crescimento dos fungos leveduriformes.

As suspensões celulares foram obtidas a partir do crescimento das leveduras, cultivadas em ágar malte, durante 48 horas, adicionando-se água destilada estéril. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer até obter-se uma suspensão com a concentração final de 10^4 células mL⁻¹.

A avaliação do crescimento de *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. foi realizada conforme as condições descritas na seção 3.1.3. O inóculo padronizado, descrito anteriormente, foi adicionado a cada frasco de cultivo, de modo a se obter uma concentração inicial de 10^4 células mL⁻¹, exceto nos frascos controle (em que não se adicionou o inóculo). O crescimento da população microbiana foi acompanhado pela formação de unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹). O crescimento foi acompanhado até 186 horas de crescimento. Alíquotas, de 100 µl, foram retiradas a cada 24 horas para a estimativa de células, pela contagem de UFC. Os frascos foram incubados a 28°C, sob agitação de 120 rpm. Ao final das 186 horas a fase oleosa destes

dois ensaios foi avaliada para se verificar a degradação dos hidrocarbonetos e de ésteres e na fase aquosa, foi avaliado o pH, presença de metabólitos e de substâncias surfactantes.

3.1.8 Curvas de crescimento em meio de cultura

A avaliação do crescimento dos fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces* sp. foi realizada em frascos de vidro, com capacidade para 150mL, com a quantidade de 50 mL de caldo malte (Anexo 9.1.3), que foi esterilizado dentro do frasco experimental. O inóculo padronizado, descrito na seção 3.1.3, foi adicionado a cada frasco de cultivo, de modo a se obter uma concentração final de 10^7 esporos mL⁻¹, exceto nos frascos controle (em que não se adicionou o inóculo). O experimento foi incubado em estufa, a 28 ° C, em três repetições. As amostras (destrutivas) foram retiradas nos seguintes tempos 7, 14, 21, 28 dias, 42 e 60 dias. Após a retirada da biomassa formada nos tempos avaliados, separou-se a fase aquosa de modo que a biomassa ficasse retida no filtro papel (previamente pesado). Na fase aquosa avaliou-se o pH, presença de metabólitos e de substâncias surfactantes. O crescimento foi avaliado pela da biomassa formada. A biomassa fúngica foi quantificada através da técnica peso seco (Anexo 9.2), conforme conduzido para os ensaios com diesel e misturas de diesel/biodiesel. Os filtros (com e sem biomassa) foram colocados em estufa a 50°C, durante 4 dias, para remoção da umidade e da estufa transferidos diretamente para um dessecador, de onde foram retirados, somente para a pesagem.

A avaliação do crescimento das leveduras *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. foi conduzida em erlenmeyrs com capacidade para 250mL, aos quais foram adicionados 160 mL de caldo GYMP (Anexo 9.1.4) que foram

então esterilizados a 121°C, durante 15min, a 1atm, em autoclave. Preparou-se um pré inóculo a partir de culturas de leveduras em ágar malte, de 48 horas de crescimento, das quais uma alçada foi utilizada para preparar o pré inóculo em 50mL de caldo GYMP. Este pré inóculo ficou sob agitação de 120rpm, a 28°C, *overnight*. O pré inóculo foi adicionado a cada frasco de cultivo, de modo a se obter uma concentração inicial de 10^4 células mL⁻¹, exceto nos frascos controle (em que não se adicionou o inóculo). A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, e confirmada pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). O crescimento da população microbiana foi acompanhado pela formação de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹). O crescimento foi acompanhado até 48 horas de crescimento. Alíquotas, de 100 µl, foram retiradas a cada 2 horas (durante as primeiras 24 horas, e após a cada 12 horas) para a estimativa de células, através da contagem de UFC. Os frascos foram incubados a 28°C, sob agitação de 120rpm. Ao final das 48 horas de crescimento, no caldo avaliou-se o pH e a presença de substâncias surfactantes. O experimento foi realizado em triplicata.

3.2 Controle do crescimento microbiano em misturas de diesel e biodiesel utilizando biocidas

Foram conduzidos experimentos para determinar a efetividade dos biocidas, na erradicação das espécies de microrganismos deteriogênicos do combustível. Inicialmente, avaliou-se a concentração mínima inibitória (CMI) para os 4 biocidas selecionados (Tabela 1). Neste sentido, foi conduzido um experimento para análises das faixas das concentrações indicadas nos testes de CMI e CMB, cujos resultados auxiliaram na condução da segunda parte da avaliação da efetividade dos biocidas, que consistiu em adicionarem-se

diferentes concentrações de biocida a um sistema com uma fase aquosa, e uma fase oleosa (misturas de biodiesel e diesel - B0, B2, B5, B100).

Os fungos testados isoladamente foram *A. fumigatus*, *Paecilomyces* sp., *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp.

Tabela 1. Biocidas selecionados para a condução dos experimentos e algumas de algumas de suas características.

Nome Comercial	Kathon® FP 1.5	Biobor JF	West Marine	BakZid®
Ingrediente Ativo	Metil Isotiazolona	Dioxaborinana	Ditiocarbamato	Metil Oxazolidina
Concentração Ingrediente Ativo	1,5%	95%	62%	90%
Dose curativa	150-300ppm	270ppm	NI*	1000ppm
Dose preventiva	100-150ppm	135ppm	NI*	100ppm
Tempo de ação	12-24hr	36-72hr	NI*	NI*
Mecanismo de ação	Grupo -SH de proteínas e inibição do CK	NI*	NI*	Inibição da síntese de proteínas
Fabricante	RohmandHass	US Borax and Chemical Corp	West Marine	MiracemaNuodex

* NI – características não informadas.

3.2.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima biocida (CMB)

A concentração mínima inibitória informa sobre a concentração mínima em que um biocida é capaz de inibir o crescimento de microrganismos, impedindo sua proliferação no meio em que está inserido, e os testes de concentração mínima biocida informam a quantidade de biocida que é necessária adicionar para eliminar os microrganismos. A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do biocida foi realizada através do método de diluição em caldo. Uma solução estoque na concentração de 2000ppm foi preparada com base na dosagem do produto. Em frascos esterilizados, com capacidade para 15mL, adicionou-se 4mL de caldo malte e 4mL da solução-

estoque do biocida de 2000ppm. Este primeiro frasco apresentou uma concentração de 1000ppm do biocida. A partir desse, foram realizadas diluições sucessivas em caldo malte, obtendo-se as concentrações de 1000ppm; 500ppm; 250ppm; 125ppm; 62,5ppm; 31,2ppm; 15,6ppm; 7,8ppm; 3,9ppm; 1,9ppm. Um frasco, contendo apenas caldo malte, constituiu o controle do teste. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os biocidas utilizados foram isotiazolonas (Kathon FP 1.5), oxazolidinas (BakZid, dioxiborinanas (BioborJF) e ditiocarbamatos (West Marine).

Tabela 2. Concentração (mg.L^{-1}) dos biocidas isotiazolona, oxazolidina, dioxiborinana e ditiocarbamato em 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9; 1,9ppm.

Concentração do biocida (ppm)	Biocida mgL^{-1}			
	<i>Isotiazolona</i>	<i>Oxazolidina</i>	<i>Dioxiborinana</i>	<i>Ditiocarbamato</i>
2000	30000	180000	190000	124000
1000	15000	90000	95000	62000
500	7500	45000	47500	31000
250	3750	22500	23750	15500
125	1875	11250	11875	7750
62,5	937	5625	5937	3875
31,2	478	2812	2968	1937
15,6	234	1406	1484	968
7,8	117	703	742	484
3,9	58	351	371	242
1,9	29	175	185	121
0	0	0	0	0

O inóculo para os fungos filamentosos foi preparado a partir de culturas com 7 dias de cultivo em ágar malte em tubos inclinados, mediante a adição de água destilada estéril e 2mL de surfactante, o Tween 80, preparado na concentração de 0,01%. O uso do surfactante teve como objetivo facilitar a dispersão dos esporos, uma vez que estes apresentam propriedades adstringentes. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer até obter-se uma suspensão com 10^7 esporos. mL^{-1} . O inóculo para os fungos

leveduriformes foi obtido a partir do crescimento das leveduras, cultivadas em tubos inclinados com ágar malte, adicionando-se água destilada estéril. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer até obter-se uma suspensão com a concentração de 10^7 células.mL⁻¹, nos frascos. Os tubos foram incubados a 28°C. As leveduras foram avaliadas após 48 horas de incubação; e, os fungos após 7 dias. A determinação da CMI foi realizada através da inibição do crescimento dos microrganismos nas diferentes concentrações do biocida testadas nestes tubos. Após determinar a concentração mínima inibitória de cada biocida sobre os microrganismos, também se avaliou a concentração biocida dos produtos, a partir da concentração em que houve inibição do crescimento, através da inoculação dos microrganismos em placas de 96 poços de poliestireno contendo caldo malte. A concentração mínima biocida (CMB) foi determinada através da ausência absoluta de crescimento dos microrganismos nas diferentes concentrações do biocida testadas.

A partir do tubo, em que houve a inibição do crescimento dos microrganismos avaliados (CMI), retirou-se uma alíquota de 50µL, que foi inoculada em placas de 96 poços de poliestireno, cada poço contendo 150µL caldo malte. Uma alíquota de 50µL dos tubos com as concentrações de biocida superiores a mínima inibitória foi retirada e inoculada em placas de 96 poços contendo 150µL caldo malte. As placas foram incubadas a 28°C, durante 7 dias para as leveduras, e 10 dias para os fungos. Assim pode-se avaliar a CMB, pois a partir da concentração de inibição, avaliou-se a concentração que seria capaz de promover a morte das células ou dos esporos.

3.2.2 Avaliação do biocida sobre o crescimento dos microrganismos em misturas de diesel e biodiesel

A avaliação dos biocidas sobre o crescimento dos microrganismos em misturas de diesel e biodiesel foi realizada em condições que pudessem informar sobre a ação do biocida na presença de uma fase aquosa e uma fase oleosa, a fim de se verificar a eficiência destes biocidas na presença de diesel e biodiesel e de uma fase aquosa.

As concentrações do biocida utilizadas foram selecionadas baseando-se em trabalhos anteriores com óleo diesel contaminado, nas especificações comerciais do biocida e nos testes de concentração mínima inibitória e concentração mínima biocida realizados. A resposta de cada microrganismo testado foi expressa através de escores que indicaram crescimento ou não em meio de cultura apropriado. Desta forma, a viabilidade de cada microrganismo foi acompanhada até não apresentar crescimento no meio de cultura.

3.2.3 Condições de cultivo

Foram preparados frascos com 4mL das misturas de óleo diesel e biodiesel (B0, B2, B5 e B100) e, 4mL de solução com meio mineral M1 na concentração final de 0, 10, 50, 100, 200 e 400 ppm do biocida Kathon FP 1.5; e, 0, 100, 300 e 500 ppm do biocida Bakzid. Cada tratamento foi realizado com 3 repetições. A cada frasco foi adicionado o inóculo correspondente para cada microrganismo citado. Os tempos estipulados para o contato com o biocida foram de 30 minutos, 1, 4, 6, 24, 48, 72 horas, 7 e 10 dias, e amostras de 50µL foram retiradas e inoculadas em placas de 96 poços contendo caldo malte. As placas com meio de cultura e com as alíquotas retiradas após cada tempo de

contato com o biocida, foram incubadas em estufa de crescimento (28°C), e observou-se a viabilidade de cada microrganismo, através da turvação nos poços com o meio de cultura, após turvação para as leveduras e após o aparecimento de micélio para os fungos filamentosos.

3.3 Análise estatística

A análise estatística dos dados referentes aos valores da biomassa, das medidas de tensão e de pH, obtidas durante as curvas de crescimento dos microrganismos, variação da área, dos picos obtidos na análise cromatográfica foi realizada com o uso do programa Statistica 7.1. Constou da análise de variância e foi complementada pelo teste de comparação de múltiplas de Tukey ao nível de 5% de significância, para verificar diferenças entre os diferentes tratamentos, nos tempos avaliados.

4. RESULTADOS

4.1 Curvas de crescimento dos fungos filamentosos em misturas de diesel e biodiesel

Na avaliação do crescimento de *A. fumigatus*, em diferentes misturas de diesel/biodiesel, em diesel e biodiesel puro, (Figuras 6 e 7) verificou-se o crescimento do fungo nos primeiros sete dias do período de experimento, em todos os tratamentos sugerindo uma ausência de fase lag ou de adaptação. Essa fase inicial de adaptação estaria relacionada a mudança de condições de cultivo dos esporos fúngicos, já que o inóculo foi preparado a partir de culturas inoculadas em ágar malte (meio rico), o que poderia induzir a uma fase de adaptação do metabolismo fúngico às novas condições (diesel e biodiesel como nova fonte de carbono e energia).

A formação de biomassa resultou em uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores aos 14 dias de crescimento, entre B0 (17,6mg) e B100 (47,2mg) (Figura 6). Essa diferença no crescimento se manteve significativa entre B100 e B0, até o final de 60 dias. Ao final de 60 dias, o desenvolvimento da biomassa de *Aspergillus fumigatus* foi 2,8 vezes maior em B100 em relação ao tratamento sem biodiesel (B0), essa proporção foi verificada ao longo do experimento. Entre o tratamento B20 e B0, observou-se diferença significativa aos 21 dias de avaliação, mantendo-se até o final do

experimento. Entre o tratamento B0 e B5, e entre B0 e B10, não se constatou diferenças significativas na formação de biomassa em nenhum dos tempos avaliados.

Em sessenta dias pode-se constatar a maior formação de biomassa em B100 (140mg), seguida por B20 (100mg), B10 (74mg) e B5 (70mg), em B0 o valor da biomassa formada foi de 48mg. Neste sentido, ao final de sessenta dias, a biomassa formada em B100 foi 1,4 vezes maior que em B20; 1,9 vezes maior do que em B10; 2 vezes maior do que em B5; e 2,9 maior do que a biomassa formada em B0. Assim, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre a biomassa formada entre B100 e B0, entre B100 e B5, entre B100 e B10, e entre B100 e B20. Também foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos B20 e B10, e entre B20 e B5. Em relação a B5 e B10, ao final de 60 dias não se constatou diferença significativa na formação de biomassa entre estes tratamentos. Entre o tratamento B0 e as misturas B5 e B10 não foram constatadas diferenças no crescimento em nenhum dos tempos avaliados. Assim, verificou-se que o biodiesel influenciou positivamente o crescimento de *Aspergillus fumigatus*, em relação ao tratamento B0, na proporção de 20%. E verificou-se que o tratamento B100, favoreceu a formação de biomassa, quando comparada aos demais tratamentos ao final de 60 dias.

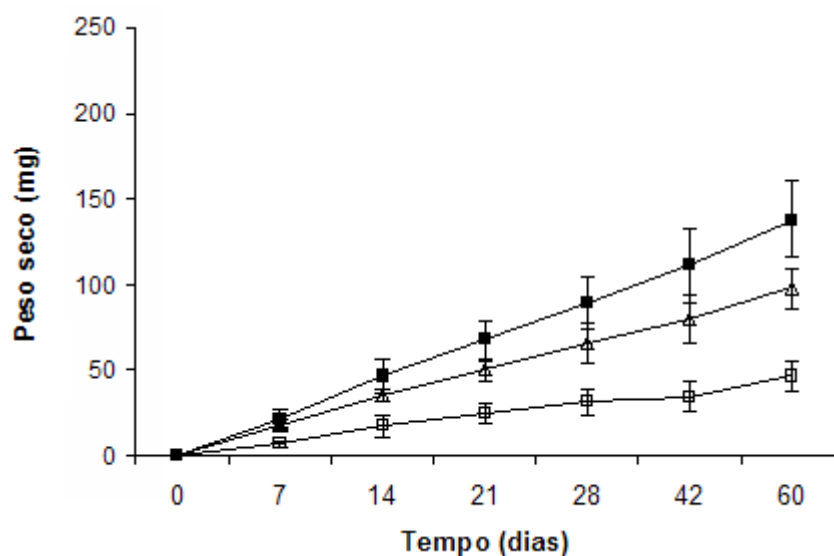


Figura 6. Curva de crescimento de *Aspergillus fumigatus* em meio mineral e somente biodiesel (B100) ou diesel (B0), durante 60 dias, a 28°C. (□) B0, (■) B100, (△) B20.

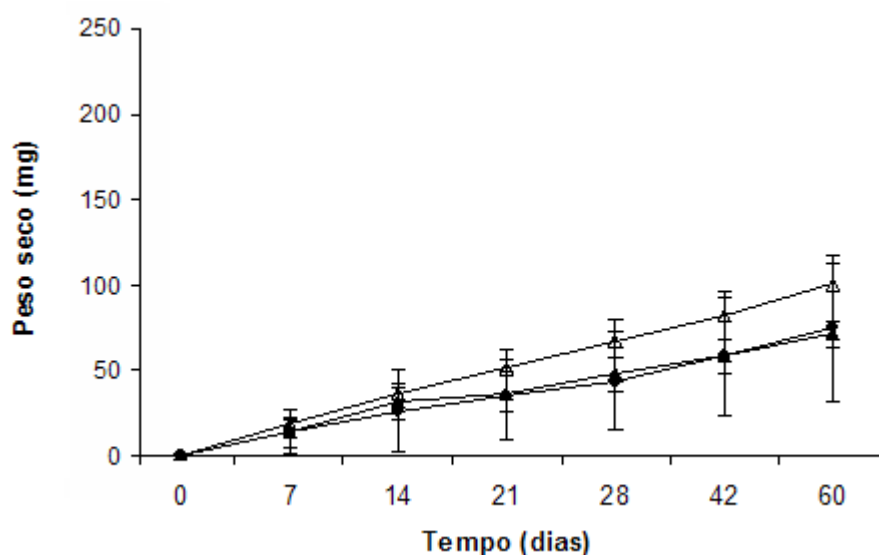


Figura 7. Curva de crescimento de *Aspergillus fumigatus* em meio mineral em diferentes misturas de diesel e biodiesel durante 60 dias, a 28°C. (▲)B5, (◆)B10, (△) B20.

O crescimento do fungo filamentosso *Paecilomyces* sp. pode ser visualizado nas Figuras 8 e 9. Nos primeiros dias de incubação, este fungo não apresentou crescimento significativo quando sua única fonte de carbono foi diesel (B0), sugerindo que estivesse ocorrendo uma fase de adaptação às

novas condições de cultivo. No entanto, a biomassa não se desenvolveu significativamente ao longo do experimento (Figura 8), indicando que o fungo não apresentou capacidade de crescimento significativo na presença somente de óleo diesel.

Nas misturas B5, B10 e B20 (Figura 9), observou-se similar formação de biomassa pelo fungo *Paecilomyces* sp., aos sete dias de incubação. Nestas misturas o valor de peso seco da biomassa foi em torno de 14mg. Nessa primeira fase, a adição de biodiesel ao diesel, promoveu um maior crescimento do fungo, em relação a B0, resultando em uma diferença significativa de formação de biomassa aos 21 dias de avaliação, entre o tratamento B0 e as misturas B5, B10 e B20. No entanto, não foi constatada diferença significativa na biomassa formada entre estas misturas no tempo 21 dias. Em relação a B0, o tratamento B100 (somente biodiesel), apresentou diferença significativa na formação de biomassa aos 14 dias, com o valor de biomassa de 41mg (Figura 8). O crescimento do fungo em B5, B10, B20 e B100, já aos sete dias indica a ausência de uma fase lag, ou de adaptação, às novas condições de crescimento a que os esporos fúngicos foram submetidos.

Nas misturas B5, B10 e B20, constatou-se que houve um desenvolvimento similar do fungo até os 42 dias de avaliação. Como se pode observar no gráfico, ao final de 60 dias, na mistura B20 há a maior formação de biomassa, atingindo o valor de 197mg, seguida por B10 (160mg), e, por B5 (123mg). Ao final de 60 dias, a biomassa formada em B20 e em B10 foi 13 vezes maior que a o valor da biomassa formada aos 7 dias; na mistura B5 a biomassa formada foi 7,7 vezes maior do que a biomassa formada aos sete dias de incubação. Em comparação ao tratamento B0, ao final de 60 dias, a

biomassa formada em B5 foi 3,6 vezes maior que a biomassa formada em B0, em B10 foi 4,6 vezes maior; em B20 foi 5,8 vezes maior; e em B100 foi 5,5 vezes maior, representando uma diferença significativa. Neste sentido, constataram-se diferenças significativas na formação de biomassa entre o tratamento B0 e os demais tratamentos, ao final de 60 dias.

Neste sentido, pode-se inferir que a adição de biodiesel ao diesel, favorece o desenvolvimento e crescimento de microrganismos, e a medida que aumentou-se o teor de biodiesel na mistura, maior foi a biomassa formada pelo fungo, ao final de 60 dias. Assim, verificou-se que o biodiesel influenciou positivamente o crescimento de *Paecilomyces* sp., em relação ao tratamento B0, na proporção de 5, 10 e 20%. E verificou-se que ao final de 60 dias não houve diferença significativa entre a biomassa formada entre o tratamento B100 e as misturas B10 e B20.

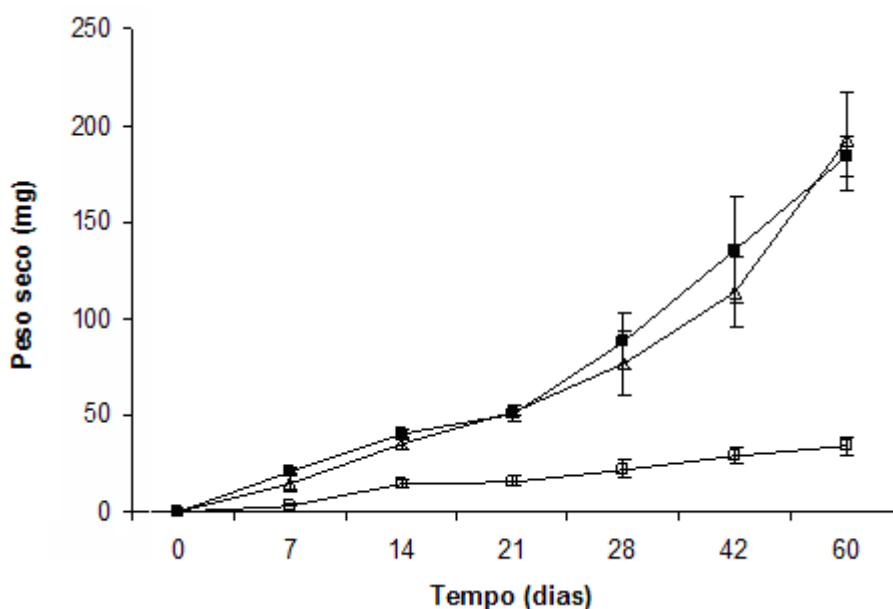


Figura 8. Curva de crescimento de *Paecilomyces* sp. em meio mineral e B100, B20 e B0, durante 60 dias, a 28°C. (□) B0, (Δ) B20 (■) B100.

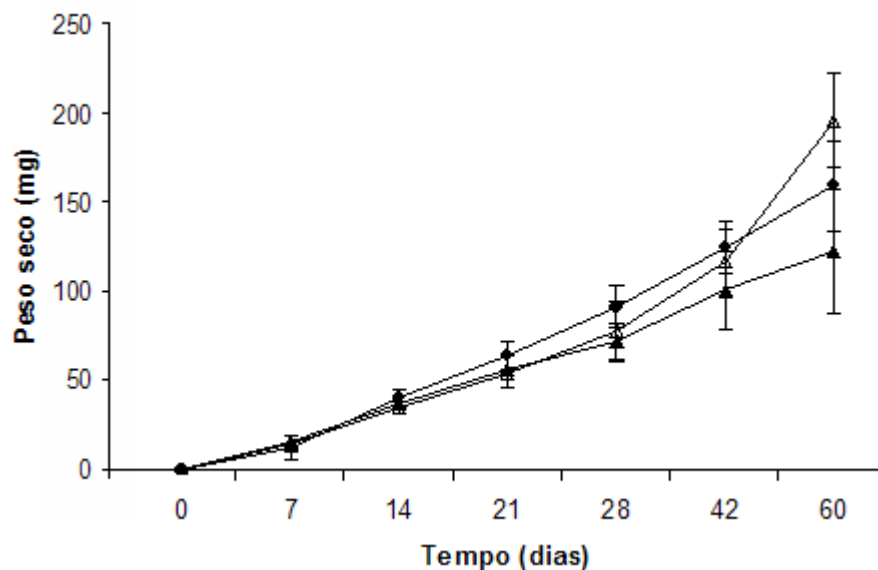


Figura 9. Curva de crescimento de *Paecilomyces* sp. em meio mineral ediferentes misturas de diesel e biodiesel durante 60 dias, a 28°C. (▲)B5, (◆)B10, (Δ) B20.

4.1.2 Fase aquosa

As fases aquosas de todos os tempos amostrados foram submetidas a testes de emulsificação e a medidas de tensão superficial com o objetivo de avaliar a produção de algum composto com ação emulsificante e/ou surfactante. Além disso, verificou-se a produção de metabólitos durante o crescimento dos microrganismos em misturas de diesel e biodiesel. Os testes de índice de emulsificação (IE 24%) não indicaram uma significativa formação de emulsificação da fase oleosa em nenhuma mistura de diesel e biodiesel (B0, B5, B10, B20 e B100) nos tempos amostrados, tanto para os tratamentos controle (sem a adição de inóculo), quanto para os tratamentos em que se adicionou o inóculo de *A. fumigatus* ou de *Paecilomyces* sp.

De acordo com a literatura os microrganismos capazes de reduzir a tensão superficial de $72,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (medida de tensão superficial da água) para a faixa de $35,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a $40,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, podem ser considerados bons produtores

de biossurfactantes, e abaixo de $35,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, indica que o microorganismo pode ser considerado um eficiente produtor (Silva, 2002). Em todos os tratamentos se pode observar redução da medida da tensão superficial da fase aquosa. Na Tabela 3, são apresentadas as variações na medida da tensão superficial observadas nos tratamentos com adição de inóculo de *A. fumigatus*, e nos tratamentos controle, ou seja, sem adição de inóculo. Pode-se observar que a redução das medidas de tensão superficial ocorreu tanto para os tratamentos controle (sem a adição de inóculo), quanto para os tratamentos em que se adicionou o inóculo de *A. fumigatus*. Aos sete dias de cultivo, se observou uma redução significativa ($p<0,05$) de $53,8\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, para $38,3\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ em B100; $41,6\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ em B20; $39,6\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ em B0; e, nas demais misturas para $44,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, nos tratamentos com desenvolvimento do fungo. Uma redução semelhante e significativa ($p<0,05$) pode ser observada nos controles, de $53,8\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para $39,2\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ em B100; e de $45,8\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ em B5; $44,7\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ em B10; e, $42,3\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ em B20. Assim, para os tratamentos citados, embora tenha ocorrido uma redução significativa da tensão superficial aos 7 dias de cultivo, essa redução ocorreu tanto para os tratamentos com a presença do fungo, quanto para os seus respectivos controles, não existindo diferença significativa entre ambos. Este comportamento foi observado ao longo de todo experimento. O único tratamento em que se observou uma maior diferença entre o tratamento controle e o tratamento com inóculo, foi em B0, em que a tensão reduziu de $53,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para $51,4\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, na ausência do fungo; e, no tratamento com adição de inóculo, para $41,6\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ nos primeiros sete dias, passando a apresentar, nos demais tempos, variação semelhante entre o tratamento e seu respectivo controle.

Os resultados de variação nas medidas de tensão superficial, nos tratamentos com *Paecilomyces* sp., são apresentados na Tabela 4. Observou-se uma redução significativa nas medidas de tensão superficial nos primeiros sete dias de cultivo ($p < 0,05$), de $53,8 \text{mN.m}^{-1}$ para $43,1 \text{mN.m}^{-1}$ em B5; $41,0 \text{mN.m}^{-1}$ em B10; $40,5 \text{mN.m}^{-1}$ em B20; e, $41,0 \text{mN.m}^{-1}$ em B100. Os controles também sofreram redução na medida de tensão superficial de $53,8 \text{mN.m}^{-1}$ para $46,9 \text{mN.m}^{-1}$ em B5; $49,3 \text{mN.m}^{-1}$ em B10; $43,3 \text{mN.m}^{-1}$ em B20; e $44,2 \text{mN.m}^{-1}$ em B100. Somente em B10 a diferença entre o controle e o tratamento com o fungo foi significativa ($p < 0,05$). No tratamento sem biodiesel (B0), o controle praticamente não sofreu alteração, pois a medida da tensão superficial na fase aquosa no tempo zero foi de $53,8 \text{mN.m}^{-1}$, e ao final dos sessenta dias foi de $52,6 \text{mN.m}^{-1}$, e na presença do inóculo a redução foi para $48,2 \text{mN.m}^{-1}$.

Tabela 3. Medidas de tensão superficial (mN.m^{-1}) obtidas para *Aspergillus fumigatus*, durante 60 dias, nas diferentes misturas de diesel e biodiesel (B0, B5, B10, B20 e B100). A tensão superficial inicial do meio mineral foi de $53,8 \text{mN.m}^{-1}$.

Tempo (dias)		Misturas				
		B0	B5	B10	B20	B100
7	Tratamento	39,7±2,6	44,1±2,3	44,4±0,9	41,4±1,5	38,4 ±1,40
	Controle*	51,5±,28	45,8±0,3	44,8±0,3	42,3±1,8	39,2 ±0,87
14	Tratamento	40,3±0,9	42,4±2,1	43,4±0,4	42,3±1,5	39,7±3,0
	Controle*	42,2±1,0	45,9±1,5	40,9±1,3	40,1±0,0	40,3±1,5
21	Tratamento	36,0±2,1	40,8±1,3	37,4±2,1	36,9±0,6	36,7±1,2
	Controle*	38,9±1,2	36,7±1,5	34,7±2,0	34,9±0,7	37,8±0,9
28	Tratamento	42,7±4,7	38,3±3,0	37,0±1,9	38,4±0,8	36,0±1,5
	Controle*	41,3±1,8	43,4±0,3	41,6±1,0	41,9±1,0	36,3±0,2
42	Tratamento	40,8±2,3	44,6±2,1	41,8±1,1	41,7±0,6	38,5±2,2
	Controle*	40,9±0,0	42,0±0,00	47,2±0,0	41,6±0,0	42,2±0,0
60	Tratamento	50,6±2,3	45,7±2,05	42,3±0,9	41,5±0,5	40,2±2,2
	Controle*	48,4±0,3	45,1±0,5	46,9±0,2	43,8±0,0	42,0±0,0

*Tratamento Controle em que não houve adição de inóculo.

Tabela 4. Medidas de tensão superficial (mN.m^{-1}) obtidas para *Paecilomyces* sp, durante 60 dias, nas diferentes misturas de diesel e biodiesel (B0, B5, B10, B20 e B100). A tensão superficial inicial do meio mineral foi de $53,8 \text{ mN.m}^{-1}$.

Tempo (dias)		Misturas				
		B0	B5	B10	B20	B100
7	Tratamento	48,2 ±1,6	43,1 ±0,9	41,0 ±1,1	40,6 ±2,6	41,0 ±0,9
	Controle*	52,6 ±1,8	47,0 ±1,3	49,4 ±2,9	43,6 ±1,5	44,3 ±1,0
14	Tratamento	41,0 ±0,7	44,2 ±1,3	39,8 ±1,5	43,4 ±4,8	42,2 ±1,7
	Controle*	43,1 ±3,0	50,3 ±5,3	42,8 ±1,5	45,1 ±1,6	41,7 ±1,6
21	Tratamento	45,0 ±1,6	50,3 ±1,7	48,1 ±1,8	43,4 ±4,9	42,2 ±1,8
	Controle*	50,7 ±1,0	47,5 ±1,5	45,7 ±1,8	36,0 ±1,11	44,0 ±1,8
28	Tratamento	45,8 ±1,5	43,4 ±1,1	46,7 ±1,3	43,2 ±2,9	40,1 ±1,4
	Controle*	43,6 ±0,9	38,9 ±1,9	45,9 ±1,5	42,4 ±1,6	36,2 ±1,6
42	Tratamento	47,7 ±0,5	45,1 ±0,6	45,2 ±1,4	42,7 ±3,0	43,3 ±0,7
	Controle*	48,38 ±0,0	45,0 ±0,4	44,9 ±1,7	40,8 ±0,8	39,6 ±2,0
60	Tratamento	44,5 ±1,8	45,9 ±1,4	46,5 ±1,3	42,3 ±0,8	43,7 ±3,6
	Controle*	49,9 ±0,2	46,4 ±0,6	43,9 ±0,7	42,7 ±1,2	38,7 ±0,7

*Tratamento Controle em que não houve adição de inóculo.

Pôde-se observar um pico de redução nas medidas de tensão superficial, aos 21 dias de incubação, para o fungo *A. fumigatus* (Tabela 3). No entanto este pico de redução, não está relacionado a uma maior formação de biomassa deste fungo em B100, por exemplo. Nos tratamentos com o fungo *Paecilomyces* sp., não se observaram picos de redução ao longo da curva, os valores de tensão superficial se mantiveram constantes ao longo dos tempos avaliados. No tempo zero, o valor da medida de tensão superficial foi de $53,8 \text{ mN.m}^{-1}$, e o menor valor observado foi aos 14 dias, na mistura B10, cujo valor foi de $39,7 \text{ mN.m}^{-1}$, e seu controle, apresentou $42,8 \text{ mN.m}^{-1}$, não sendo uma diferença significativa. Nas Figuras 10 e 11, após 60 dias, verifica-se um crescimento significativo de *Paecilomyces* sp. nas misturas B100 e B20, no entanto, não houve uma redução nos valores de tensão superficial que pudesse indicar uma relação entre crescimento do microrganismo e a produção de biossurfactantes, nas condições em que o experimento foi realizado.

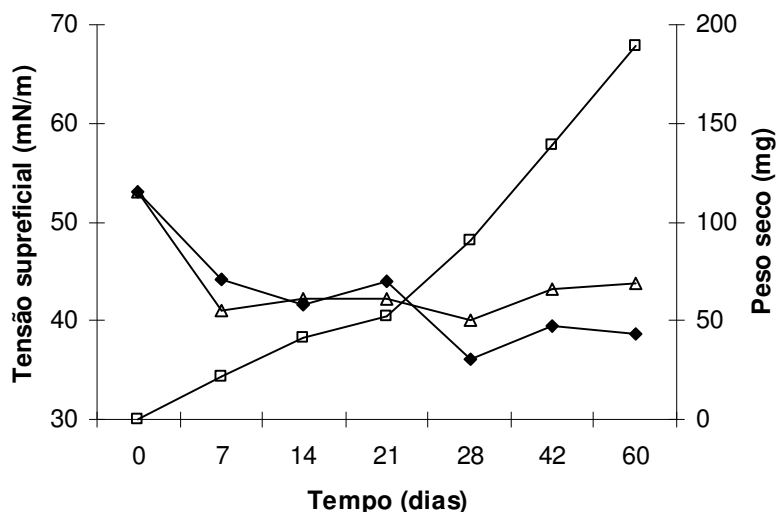


Figura 10. Curva de crescimento de *Paecilomyces* sp. e medidas da tensão superficial, em tratamento com meio mineral e 100 % de biodiesel (B100), por 60 dias a 28°C. (□) Biomassa (mg); (◆)Tensão superficial do tratamento sem inóculo; (△)Tensão superficial do tratamento com inóculo.

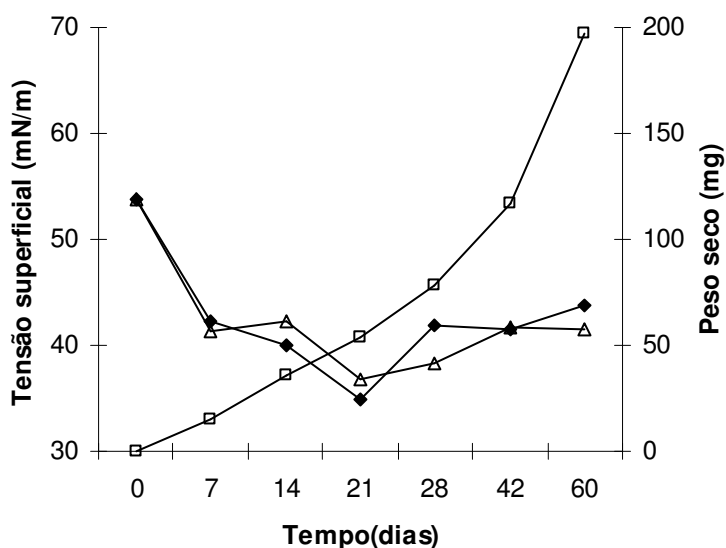


Figura 11. Curva de crescimento de *Paecilomyces* sp. e medidas da tensão superficial, em tratamento com meio mineral e mistura de diesel 20% de biodiesel (B20), por 60 dias a 28°C. (□)Biomassa (mg); (◆)Tensão superficial do tratamento sem inóculo; (△)Tensão superficial do tratamento com inóculo.

A variação das medidas de pH, durante 60 dias, nas diferentes misturas de diesel e biodiesel podem ser visualizadas nas Figuras 12 e 13 para *Aspergillus fumigatus*, e nas Figuras 14 e 15 para *Paecilomyces* sp.

Nas Figuras 12 e 13 tem-se um comparativo das medidas de pH entre todas as misturas de diesel e biodiesel durante os 60 dias de crescimento, na presença de *A. fumigatus*. Nos tratamentos com *A. fumigatus* (Figura 12) não se verificou um decréscimo significativo do pH. Ao final de 60 dias a fase aquosa dos tratamentos apresentaram as seguintes medidas de pH: em B100 6,6; em B20 6,7; em B10 e B5 6,8; e em B0 6,9. Os controles (Figura 13), ou seja, os tratamentos sem adição de inóculo, ao final de 60 dias, apresentaram as seguintes medidas de pH em B100 6,9; em B20 e B10 7,0; em B5 6,9; e em, B0 7,0.

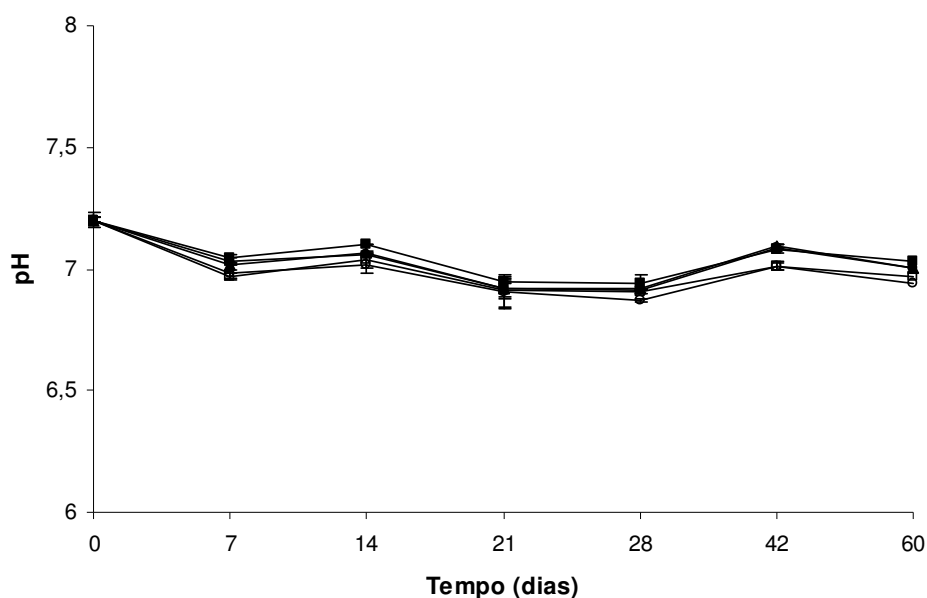


Figura 12. Valores das medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos B0, B5, B10 B20 e B100, sem inoculação de *Aspergillus fumigatus*, durante 60 dias, a 28 °C. (■) B0; (○)B5; (▲)B10; (●) B20, (□) B100.

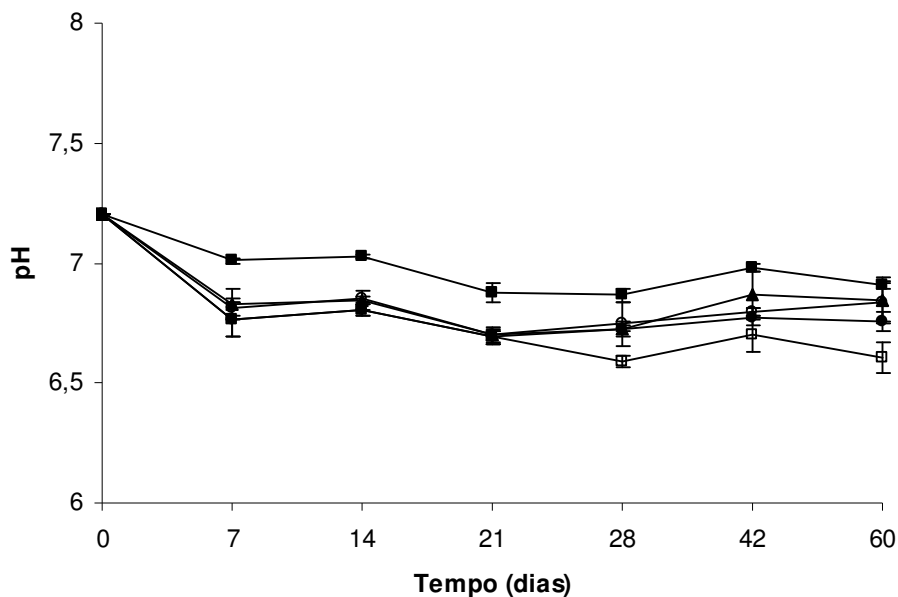


Figura 13. Valores das medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos B0, B5, B10 B20 e B100, com *Aspergillus fumigatus*, durante 60 dias, a 28 °C: (■) B0; (○)B5; (▲)B10; (●) B20, (□) B100.

Nas Figuras 14 e 15 tem-se um comparativo entre os valores de medidas de pH entre todas as misturas de diesel e biodiesel, durante os 60 dias de crescimento, na presença de *Paecilomyces* sp. Nos tratamentos com *Paecilomyces* sp. (Figura 14) não se verificou um decréscimo significativo do pH. A fase aquosa dos tratamentos apresentou as seguintes medidas de pH ao final de 60 dias: em B100 e em B20 6,5; em B10 e B5 6,7; e em B0 7,2. Os controles (Figura 15), ou seja, os tratamentos sem adição de inóculo, apresentaram as seguintes medidas de pH ao final de 60 dias: em B100 7,0; em B20 e em B10 7,1; em B5 7,2; e em B0 7,3.

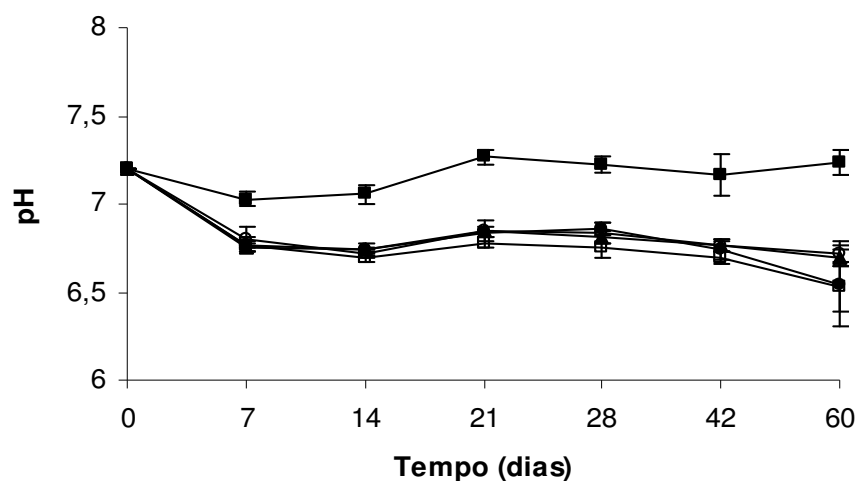


Figura 14. Medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos contendo misturas de diesel e biodiesel, diesel ou biodiesel, na presença de *Paecilomyces sp.* acompanhada por 60 dias, a 28 °C. (■) B0; (○)B5; (▲)B10; (●) B20, (□) B100.

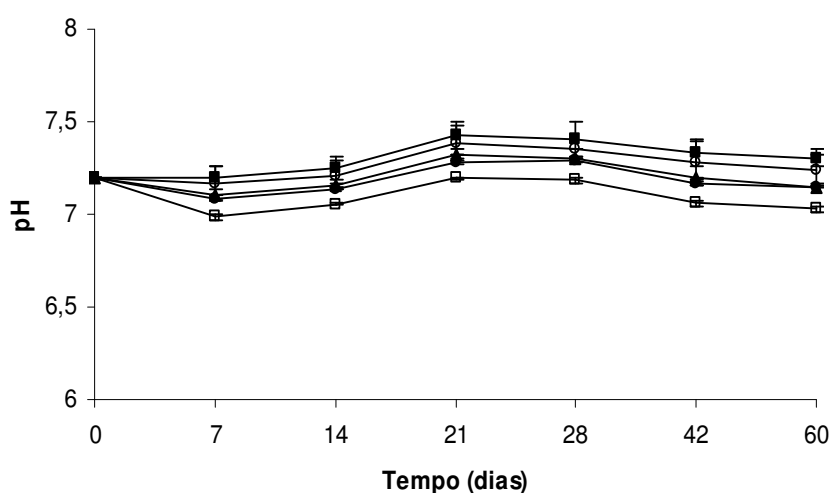


Figura 15. Medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos contendo misturas de diesel e biodiesel, diesel ou biodiesel, sem *Paecilomyces spp.* acompanhado por 60 dias, a 28 °C. (■) B0; (○)B5; (▲)B10; (●) B20, (□) B100.

Para avaliar o efeito tamponante do Meio Mineral M1, utilizado nos experimentos deste trabalho, conduziu-se um ensaio conforme sugerido por Bento (2001). Desta forma o poder tamponante do meio mineral utilizado neste estudo pode ser visualizado na Tabela 5. Para haver uma redução no pH do meio mínimo mineral de 7,2 para 6,7, foi necessário adicionar 0,2 mL de HCl a 1N. A concentração de fosfatos do Meio Mineral M1 é de 4,45g.L⁻¹. Dessa

forma, neste experimento a produção de ácidos por *A. fumigatus* e *Paecilomyces* sp., pode ter sido mascarada pelo poder tamponante dos fosfatos presentes no meio Mineral M1.

Tabela 5. Avaliação do efeito tampão do meio mineral M1, devido a presença de fosfatos na concentração de $4,45 \text{ g.L}^{-1}$, com quantidades crescentes de NaOH 1 N e HCl 1 N, em 25 mL do meio Mineral M1.

Volume adicionado	HCL (1 N)		NaOH (1 N)	
	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final
0,1mL	7,2	6,95	7,13	7,36
0,2 mL	7,18	6,75	7,14	7,52
0,3 mL	7,17	6,49	7,15	7,8
0,4 mL	7,15	6,22	7,15	8,14
0,5 mL	7,16	5,78	7,15	8,38
0,6 mL	7,16	3,5	7,14	8,66
0,7 mL	7,15	2,83	7,15	8,95
0,8 mL	7,14	2,69	7,16	9,12
0,9 mL	7,15	2,77	7,14	9,27
1 mL	7,15	2,7	7,17	10

4.2 Curva de crescimento dos fungos leveduriformes em misturas de diesel e biodiesel

Inicialmente avaliou-se o potencial de crescimento das leveduras *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. em diferentes misturas de diesel e biodiesel. A primeira avaliação foi determinar a concentração de óleo que seria utilizada nos experimentos de crescimento das leveduras; e a segunda etapa foi a avaliação de qual tratamento (B0, B5, B10, B20 ou B100) seria o mais favorável ao crescimento das leveduras. Desta forma, na primeira etapa, todos os frascos, exceto o controle (em que não houve inoculação das leveduras), mudaram sua coloração de incolor para lilás, indicando a redução do TTC a TPF, devido a oxidação do combustível, após três dias de incubação. Indicando que as leveduras são capazes de se desenvolver e utilizar a mistura

(diesel/biodiesel) como fonte de carbono e energia. Como a mudança de cor ocorreu ao mesmo tempo para todas as concentrações (0,01%, 0,1%, 0,5%; 1% e 10%), foi baseando-se em trabalho desenvolvido por Bento *et al.* (2005) que se optou por utilizar a concentração de 1% de óleo em relação ao meio mínimo mineral (M1), para ser utilizada na condução da curva de crescimento.

Na segunda etapa se verificou a capacidade de biodegradação diesel (B0), das misturas de diesel e biodiesel (B5, B10 e B20) e de 100% de biodiesel (B100), pelas leveduras, adicionando-se 1% do combustível, ao meio mineral M1 contendo TTC. Além disso, foi levado em consideração qual dos combustíveis seria degradado mais rapidamente, ou seja, a mistura na qual haveria mudança de cor da fase aquosa, de incolor para lilás, em menor tempo. Os dois primeiros combustíveis em que isso ocorreu foi em B20 e B100. Essas formulações foram escolhidas para avaliar o crescimento das leveduras *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp., e a capacidade de degradar os combustíveis.

O crescimento das leveduras *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. pode ser observado nas Figuras 16 e 17, respectivamente. Ao observar a Figura 16, pode-se perceber que não houve uma fase de aclimação das células de *Candida silvicola* às novas condições de cultivo, apresentando um crescimento exponencial; no biodiesel puro (B100), a concentração inicial de células era de 10^4 UFC.mL⁻¹, e após 48 horas aumentou para 10^8 UFC.mL⁻¹. Esta etapa foi seguida por uma fase em que a contagem do número de UFC (unidades formadoras de colônias) se estabilizou durante 4 dias, sugerindo uma fase estacionária de crescimento, no entanto no sexto dia de incubação (144 horas) observou-se um novo aumento na contagem de UFC, sugerindo

que a fase anterior, ao invés de estacionária, possa ser de uma adaptação as fontes de carbono disponíveis. Na mistura B20, também não se observou a fase inicial de aclimatação das leveduras, apresentando um crescimento exponencial até 96 horas de incubação, quando a contagem chegou a 10^8 UFC.mL⁻¹. A fase estacionária de crescimento, foi observada a partir de 96 horas de incubação, e se manteve durante 3 dias. E, a partir de 144 horas de cultivo, se observou uma redução na contagem das células viáveis, sugerindo que esta população estaria em fase de declínio ou morte.

O crescimento da levedura *Rhodotorula* sp., na mistura B20 e em B100 pode ser observado na Figura 17. No tratamento B100 se observou uma fase de aclimatação (ou lag) da levedura nas primeiras 24 horas de incubação. A partir do primeiro dia foi observada uma fase exponencial de crescimento, a qual se estendeu durante 3 dias, atingindo 10^8 UFC.mL⁻¹. Este número de UFC.mL⁻¹ se manteve durante as 24 horas seguintes (o que poderia indicar uma fase estacionária, ou uma nova fase de aclimatação), quando se observou novamente uma fase exponencial, chegando a contagem de 10^{10} UFC.mL⁻¹ em mais 24 horas de incubação. Aos 7 dias, se observou um declínio na contagem das células viáveis. Na mistura B20, a fase de aclimatação das leveduras durou 48 horas, quando se observou uma fase exponencial de crescimento, que persistiu por 4 dias. A contagem chegou a 10^7 UFC.mL⁻¹, em 144 horas de incubação, após se observa um declínio na contagem das células viáveis, sugerindo uma fase de declínio (ou morte).

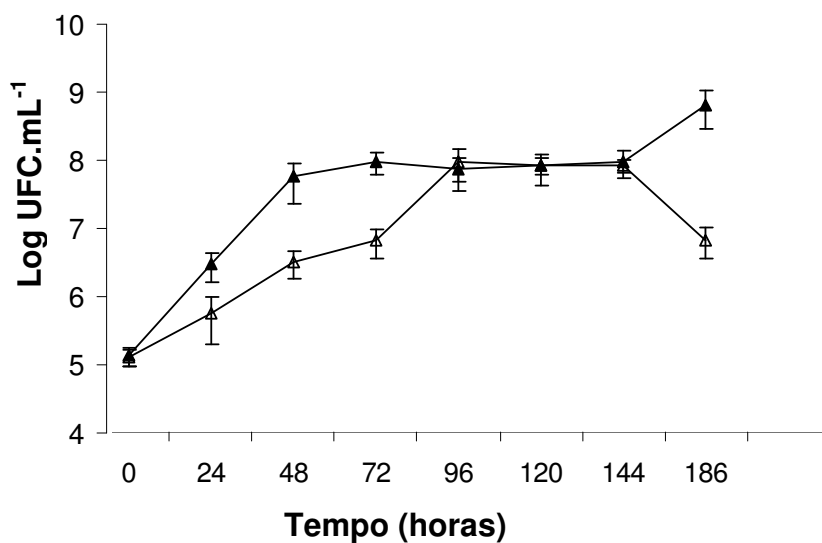


Figura 16. Curva de crescimento (UFC.mL⁻¹) de *Candida silvicola*, para tratamento com meio mineral e 100% de biodiesel (B100) e 20% de biodiesel (B20). (▲)B100; (△) B20.

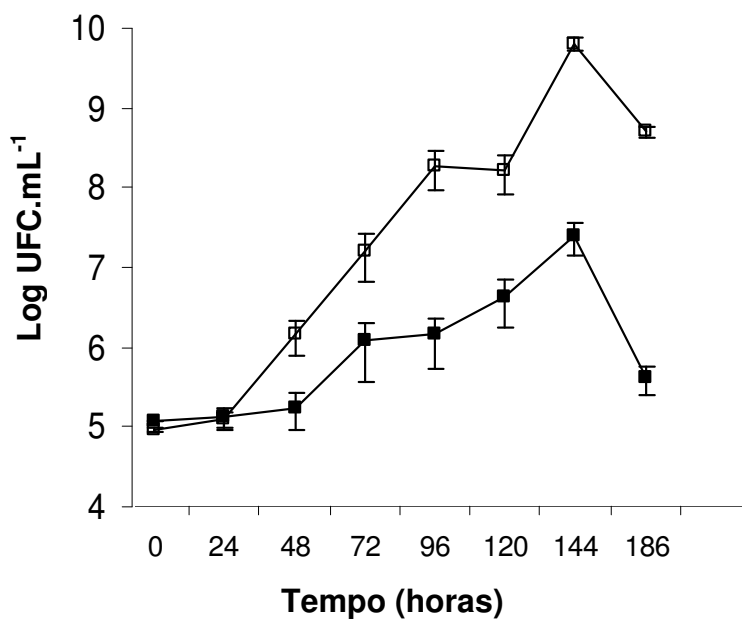


Figura 17. Curva de crescimento (UFC.mL⁻¹) de *Rhodotorula sp.*, para tratamento com meio mineral e 100% de biodiesel (B100) e 20% de biodiesel (B20). (□) B100; (■) B20.

4.2.1 Fase aquosa

A observação da camada oleosa dos experimentos indicou que ela apresentava-se emulsificada nos tratamentos B100, tanto na presença de *Candida silvicola*, quanto de *Rhodotorula* sp. As características da fase oleosa emulsificada eram gotas de óleo de cor esbranquiçada sobre a fase aquosa. Essa coloração não foi observada no tratamento controle, em que o óleo se mantinha como havia sido adicionado ao meio, cor amarelada e transparente, e distribuído de forma homogênea sobre a fase aquosa. Ao realizar os ensaios para verificar a produção de surfactantes com características emulsificante, utilizando-se o índice de emulsificação (IE 24 %) não se obteve, no entanto, a formação de emulsão em nenhum dos tratamentos.

Na Tabela 6, se pode verificar as medidas de tensão superficial obtidas após 7 dias de incubação, em tratamentos com 1% de biodiesel (B100), ou com 1% da mistura B20, adicionado ao meio mineral, dos experimentos realizados com *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. Verifica-se que, em relação ao tratamento controle (sem adição de inóculo), houve uma redução significativa ($p < 0,05$) tanto para a mistura B100, quanto para mistura B20, quando *Candida silvicola* foi inoculada no meio. Na presença de biodiesel (B100), a redução foi de $53,8 \text{mN.m}^{-1}$ para $35,3 \text{mN.m}^{-1}$, e o controle apresentou uma redução de $53,8 \text{mN.m}^{-1}$ para $43,5 \text{mN.m}^{-1}$. Para o tratamento B20, a redução da medida de tensão superficial foi de $53,8 \text{mN.m}^{-1}$ para $40,9 \text{mN.m}^{-1}$, e no controle (sem adição de inóculo) foi de $53,8 \text{mN.m}^{-1}$ para $46,0 \text{mN.m}^{-1}$. No ensaio realizado com *Rhodotorula* sp., foi observada redução significativa somente na mistura B100, em relação ao tratamento controle. A redução, neste caso, foi de $53,8 \text{mN.m}^{-1}$ para $36,9 \text{mN.m}^{-1}$, valor próximo ao observado para *C.*

silvicola. No tratamento com a mistura B20, a medida de tensão superficial ($47,6\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) ficou próxima ao tratamento controle ($46,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$). As duas leveduras foram capazes de reduziram as medidas de redução superficial durante o crescimento no tratamento B100, assim, *C.silvicola* reduziu a medida da tensão superficial da fase aquosa de $53,8\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para $35,3\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, e *Rhodotorula* sp. de $53,8\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para $36,9\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. A redução das medidas da tensão superficial e emulsificação da fase oleosa (observação visual do experimento) em B100, indicam a capacidade destas em produzir algum composto com capacidade surfactante.

O objetivo de avaliar as medidas de pH foi verificar a produção de compostos com características ácidas ou básicas. As medidas do pH ao final de sete dias de crescimento, de *C. silvicola* e *Rhodotorula* sp., em B20 e em B100, podem ser visualizadas na Tabela 6. No tratamento B100, a medida de pH foi de 6,7, e em B20 foi de 6,8. A medida inicial de pH do meio mineral foi de 7,2, e o controle dos tratamentos (em que não houve adição de inóculo), manteve-se muito próximo a esse valor, ao final de sete dias de incubação, assim, em B100 a medida do pH foi de 7,14, e em B20 foi de 7,13. A medida de pH ao final de sete dias no tratamento B100, na presença de *Rhodotorula* sp., foi semelhante a da *Candida silvicola*, registrando-se 6,7. Na mistura B20, *Rhodotorula* sp. apresentou o menor crescimento, e a medida de pH foi de 7,0. Assim como para as fases aquosas dos experimentos dos fungos filamentosos, em que o Meio Mineral M1 também foi utilizado, a presença de fosfatos na composição ($4,45\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) também pode ter mascarado a produção de ácidos, durante o crescimento das leveduras utilizando diesel e biodiesel como fonte de carbono e energia.

Tabela 6. Medidas da tensão superficial e medidas de pH da fase aquosa de tratamentos com *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp., e tratamento controle(em que não houve adição de inóculo).

Microrganismo	Tratamento	Tensão superficial (mN.m ⁻¹)	pH
<i>Candida silvicola</i>	B100	35,3 ± 0,3	6,7 ± 0,0
	B20	40,9 ± 0,1	6,8 ± 0,0
<i>Rhodotorula</i> sp.	B100	36,9 ± 0,1	6,7 ± 0,0
	B20	47,6 ± 0,7	7,0 ± 0,0
Controle	B100	43,5 ± 0,7	7,1 ± 0,0
	B20	46,0 ± 0,0	7,1 ± 0,0

4.3 Fase oleosa

A avaliação da degradação do biodiesel (B100) foi realizada com amostras provenientes do ensaio de crescimento com os microrganismos isolados, após 60 dias para *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces* sp., e após 186 horas para *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. Os resultados foram expressos em porcentagem de degradação de cada pico em relação ao controle (Tabela 7). Os cromatogramas mostrando a degradação de biodiesel (B100) dos tratamentos com incubação dos microrganismos e dos tratamentos controle (sem inóculo) estão no Anexo 9.5.

Na comparação da degradação entre os fungos filamentosos, o fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou maior atividade de degradação do que *Paecilomyces* sp. Ambos apresentaram degradação preferencial pelas cadeias C16(ácido palmítico) e C18 (ácido esteárico), no entanto, o fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou maior percentual de degradação em C16 e C18, 15.27% e 15.26% respectivamente, e *Paecilomyces* sp, apresentou atividade degradadora de 0.55% e 3.54%, nas mesmas cadeias. Esta atividade de degradação é comparada aos tratamentos controles em que não houve adição de microrganismos.

As leveduras foram os microrganismos que apresentaram as maiores taxas de degradação, destacando-se *Candida silvicola*, com 100% de degradação de todas as cadeias. *Rhodotorula* sp. apresentou maior atividade de degradação em C18:3(ácido linolênico), de 39.4%, seguido por C18:1 (ácido oléico) e C16, 14.87% e 20.99%, respectivamente.

Tabela 7. Avaliação da degradação de biodiesel proveniente da avaliação de crescimento de microrganismos após 60 dias, para *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces* spp. e após 186 horas para *Rhodotorula* spp. e *Candida silvicola* em meio mínimo mineral e biodiesel.

Degradação(%)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Candida silvicola</i>
B100				
C16	15.27	0.55	20.99	100
C18	15.26	3.54	⁻¹ 5.28	100
C18:1	-7.69	-0.47	14.87	100
C18:2	5.46	0.49	⁻¹ 1.25	100
C18:3	-7.32	0.29	39.64	100

4.4 Curvas de crescimento em meio de cultura

O crescimento dos fungos filamentosos, *Aspergillus fumigatus* e de *Paecilomyces* sp., em caldo malte são apresentados nas Figuras 18 e 19, respectivamente. O fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou uma fase lag (ou de adaptação) às condições de crescimento a que foi submetido, nos primeiros sete dias de avaliação. O fungo apresentou uma fase de constante crescimento até o final dos 60 dias de avaliados (Figura 18), quando a biomassa formada ficou em torno de 2,15g.

O fungo *Paecilomyces* sp. apresentou uma fase lag (de adaptação) às novas condições de cultivo a que foi submetido durante os primeiros sete dias de avaliação (Figura 19). Pode-se observar o crescimento do fungo até 14 dias de avaliação, quando seu peso ficou em torno de 404 miligramas. A partir

deste momento, foi verificado que não houve mais produção de biomassa cujo valou permaneceu constante até o final da avaliação do experimento.

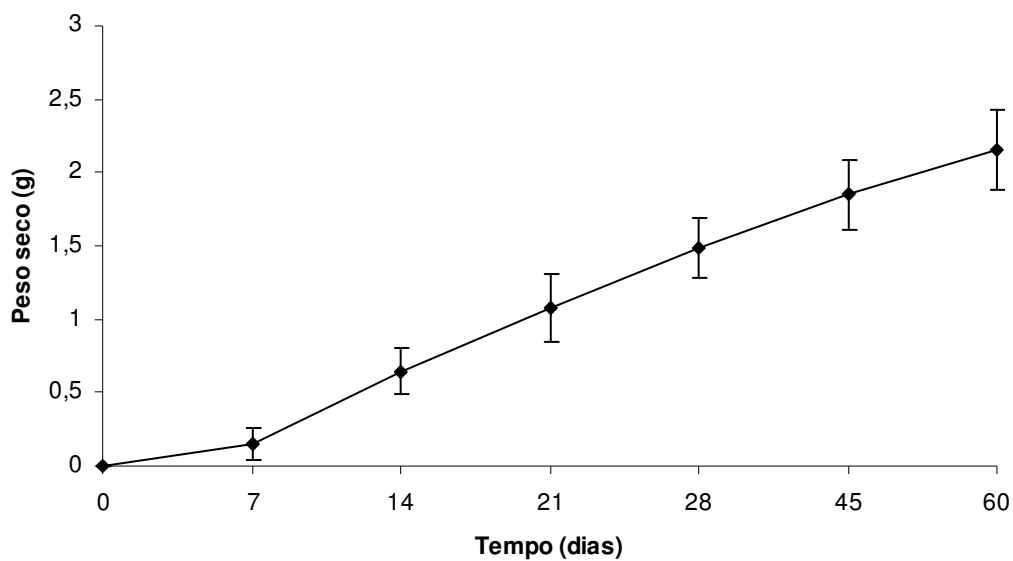


Figura 18. Curva de crescimento de *Aspergillus fumigatus*, em meio de cultura caldo malte, avaliada durante 60 dias, a 28° C.

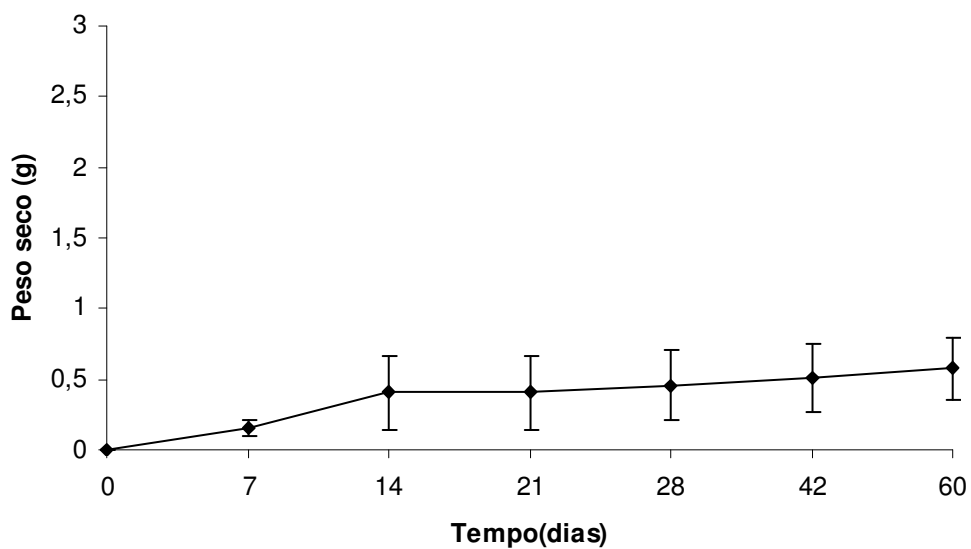


Figura 19. Curva de crescimento de *Paecilomyces* sp., em meio de cultura caldo malte, avaliada durante 60 dias, a 28° C.

Na Tabela 8 são apresentadas as variações na medida da tensão superficial observadas nos tratamentos com adição de inóculo de *A. fumigatus*, e *Paecilomyces* sp., e dos tratamentos controle, ou seja, sem adição de inóculo. Pode-se observar as medidas de tensão superficial são semelhantes entre os tratamentos controle (sem a adição de inóculo), o tratamento em que se adicionou o inóculo de *A. fumigatus*, até os 28 dias de avaliação. Aos 45 e 60 dias pode-se observar um crescente aumento nas medidas da tensão superficial, no tratamento com *Aspergillus fumigatus*. O tratamento controle aos 45 dias passou da medida de $52,1\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para a medida de $50,3\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, e na presença do fungo $56,6\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. As 60 dias, o controle praticamente se manteve na mesma medida, $51,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, e o tratamento com o fungo ficou em $61,4\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Os resultados de variação nas medidas de tensão superficial, nos tratamentos com *Paecilomyces* sp., são apresentados na Tabela 8. Observou-se uma redução significativa nas medidas de tensão superficial nos primeiros sete dias de cultivo ($p < 0,05$), de $51,8\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para $33,4\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Os controles também não sofreram redução na medida de tensão superficial permanecendo na faixa de $51,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. A redução observada aos 7 dias de cultivo se manteve ao longo dos 60 dias de avaliação, chegando a medida de $28,4\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. O tratamento controle manteve-se na faixa de $51\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ até o final do experimento.

As medidas de pH das curvas de crescimento de *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces* sp. podem ser verificadas na Tabela 8. Nos tratamentos com *A. fumigatus* (Tabela 8) se verificou um decréscimo pH de 5,4

para 4,8 aos 7 dias de cultivo. Nos demais tempos de avaliação observou-se um crescente aumento do pH ao longo do tempo, chegando a medida de 6,2 ao final de 60 dias. Nos tratamentos com *Paecilomyces* sp. (Tabela 8) se verificou um aumento significativo do pH ao longo do experimento, passando de 5,4 no início da avaliação para 7,9, ao final de 60 dias. As medidas de pH do tratamento controle se mantiveram na faixa de 5 a 5,4, com pequenas variações ao longo do experimento.

Tabela 8. Medidas da tensão superficial (mN.m^{-1}) e medidas de pH das curvas de crescimento em caldo malte de *Aspergillus fumigatus* e de *Paecilomyces* sp. e tratamento controle.

Tempo	<i>A.fumigatus</i>		<i>Paecilomyces</i> sp.		Controle	
	Tensão superficial	pH	Tensão superficial	pH	Tensão superficial	pH
0 dias	51,8±0,0	5,4	51,8±0,0	5,4	51,8±0,0	5,4
7 dias	52,6±0,7	4,8	33,4±0,2	5,2	51,3±0,6	5,2
14 dias	53,2±0,0	5,0	33,3±0,1	6,9	49,9±0,0	5,2
21 dias	52,2±0,1	5,1	32,3±0,4	6,9	50,5±0,7	5,2
28 dias	52,1±0,3	5,3	30,5±0,3	7,0	51,8±0,0	5,1
45 dias	56,5±0,3	5,9	29,3±0,1	7,5	50,3±1,4	5,1
60 dias	61,4±1,7	6,1	28,5±1,4	7,9	51,0±0,1	5,0

O crescimento das leveduras *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. pode ser observado nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Ao observar a Figura 20, pode-se perceber que houve uma fase de aclimação das células de *Candida silvicola* às condições de cultivo, durante as primeiras 6 horas de avaliação. Após este período, a população passa a uma fase exponencial de crescimento formando 10^9 UFC.mL⁻¹, após 24 horas de avaliação. Esta contagem permaneceu durante as 24 horas seguintes, indicando uma fase estacionária no crescimento. O crescimento da levedura *Rhodotorula* sp., em caldo GYMP pode ser observado na Figura 21. Neste meio de cultura, se observou uma fase de aclimação (ou lag) da levedura nas primeiras 6 horas de incubação. A partir deste período observada uma fase exponencial de

crescimento, a qual se estendeu até as 24 horas de crescimento, atingindo 10^8 UFC.mL⁻¹. Este número de UFC.mL⁻¹ se manteve durante as 12 horas seguintes indicando uma fase estacionária do crescimento. Após 36 horas de avaliação observou-se uma redução na contagem das UFC, indicando uma fase de declínio ou morte da população.

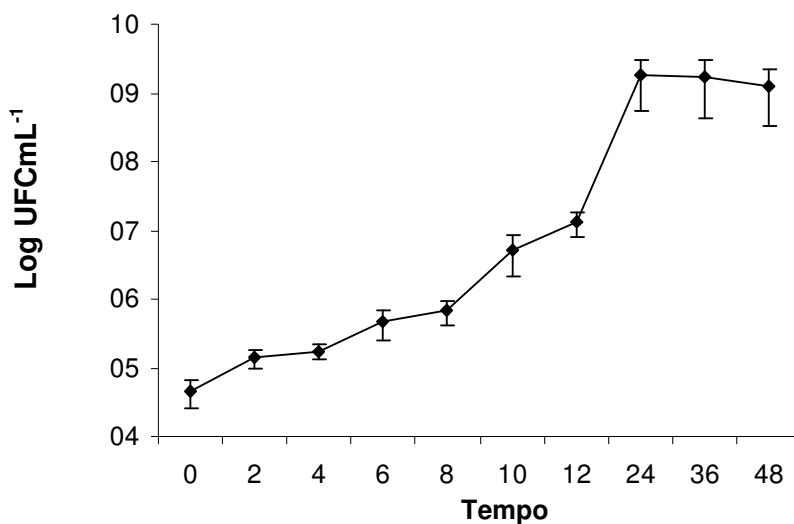


Figura 20. Curva de crescimento de *Candida silvicola*, em caldo GYMP, avaliada por 48 horas.

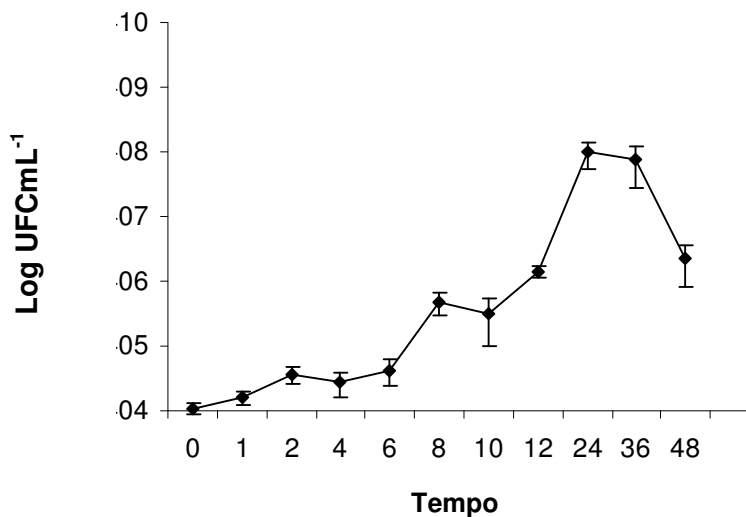


Figura 21. Curva crescimento de *Rhodotorula sp.*, em caldo GYMP, avaliada por 48 horas.

Na Tabela 9, se pode verificar as medidas de tensão superficial obtidas após 48 horas de incubação, em caldo GYMP, da curvas padrão de *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. Verifica-se que, em relação ao tratamento controle (sem adição de inóculo), houve uma redução significativa ($p < 0,05$) tanto para a mistura B100, quanto para mistura B20, quando *Candida silvicola* foi inoculada no meio. Na curva de crescimento de *Candida silvicola* houve um aumento de $40,6 \text{ mN.m}^{-1}$ para $52,2 \text{ mN.m}^{-1}$, e o controle manteve a medida apresentada inicialmente ($40,6 \text{ mN.m}^{-1}$). Para a curva de crescimento de *Rhodotorula* sp. o aumento da medida de tensão superficial foi de $40,6 \text{ mN.m}^{-1}$ para $56,1 \text{ mN.m}^{-1}$. Em nenhum dos casos constatou-se uma redução significativa nas medidas de tensão superficial.

As medidas de pH das curvas de crescimento de *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. podem ser verificadas na Tabela 9. As medidas do pH ao final de 48 horas de crescimento, de *C. silvicola* foram em média de 6,7. A medida inicial de pH do GYMP foi de 7,2, e o controle dos tratamentos (em que não houve adição de inóculo), manteve-se muito próximo a esse valor, ao final de 2 dias de incubação a medida do pH foi de 7,1. A medida de pH ao final de 2 dias na curva de crescimento de *Rhodotorula* sp., foi semelhante a da *Candida silvicola*, registrando-se 6,7.

Tabela 9. Medidas da tensão superficial e medidas de pH da fase aquosa de tratamentos com *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp., e tratamento controle ao final de 48 horas.

Microrganismo	Tensão superficial (mN.m^{-1})	pH
<i>Candida silvicola</i>	$52,2 \pm 0,3$	6,7
<i>Rhodotorula</i> sp	$56,10 \pm 0,3$	6,7
Controle	$40,6 \pm 0,0$	7,2

4.5 Controle do crescimento microbiano em misturas de diesel metropolitano com biodiesel utilizando dois biocidas

4.5.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Biocida (CMB)

A concentração mínima inibitória (CMI) de um biocida corresponde a menor concentração em que um agente antimicrobiano impede o crescimento visível de um microorganismo no teste de sensibilidade por diluição, em ágar ou caldo, enquanto a concentração mínima biocida (CMB) se refere à quantidade do biocida que é capaz de erradicar a população alvo (ANVISA, 2006; Chelossi&Faimaili, 2006; Cury *et al.*, 2007). Pode-se observar na Tabela 10 o resultado da ação do biocida cujos ingredientes ativos são 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin3-ona (1.15%) e 2-metil-4 isotiazolin-3-ona (0.35%) sobre os microrganismos nas diferentes concentrações. Podemos observar que o fungo *Aspergillus fumigatus* foi o microrganismo mais suscetível a este biocida, cujo crescimento foi inibido com a concentração de 15 ppm do produto. A partir da concentração de 31ppm, observou-se ação esporostática sobre o fungo *Paecilomyces* sp. As leveduras *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. tiveram seu crescimento inibido com a partir da concentração de 125ppm, indicando uma menor suscetibilidade a ação do biocida que os fungos filamentosos. Estas concentrações apresentaram efeito esporostático ou biostático, ou seja, atuando de forma a inibir o crescimento destes microrganismos, a avaliação da concentração mínima biocida determinou que atividade biocida sobre *Paecilomyces* sp. foi a partir de 62ppm, sobre *A.fumigatus* a partir de 31ppm e, sobre *C. silvicola* a partir de 250ppm, ou seja, a atividade biocida, sobre estes microrganismos, foi em concentrações maiores do que a dosagem para a

inibição do crescimento. O crescimento da levedura *Rhodotorula* sp. foi inibido a partir de 125ppm, e esta concentração mostrou-se biocida sobre as células desta levedura.

Tabela 10. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) da isotiazolona diante de *Aspergillus fumigatus*, *Candida silvicola*, *Paecilomyces* sp., e *Rhodotorula* sp.

Concentração do biocida (ppm)	Microrganismo			
	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>A. fumigatus</i>	<i>C.silvicola</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.
2000	-	-	-	-
1000	-	-	-	-
500	-	-	-	-
250	-	-	-	-
125	-	-	-	-
62,5	-	-	+	+
31,2	-	-	+	+
15,6	+	-	+	+
7,8	+	+	+	+
3,9	+	+	+	+
1,9	+	+	+	+
0	+	+	+	+

Simbologia

+ crescimento detectado nos tubos

- sem crescimento detectado

Na Tabela 11 encontram-se descritos os resultados da concentração mínima inibitória referente ao biocida ditiocarbamato. Pode-se observar que este biocida foi incapaz de inibir o crescimento das duas leveduras, nas concentrações avaliadas. O ditiocarbamato inibiu o desenvolvimento de *A. fumigatus* a partir de 15 ppm, e para *Paecilomyces* sp. a partir de 7 ppm, nestas mesmas concentrações apresentaram atividade esporicida sobre os esporos fúngicos.

Tabela 11. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) do biocida ditiocarbamato diante de *Aspergillus fumigatus*, *Candida silvicola*, *Paecilomyces* sp. e *Rhodotorula* sp.

Concentração do biocida (ppm)	Microrganismo			
	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. silvicola</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.
2000	-	-	+	+
1000	-	-	+	+
500	-	-	+	+
250	-	-	+	+
125	-	-	+	+
62,5	-	-	+	+
31,2	-	-	+	+
15,6	+	-	+	+
7,8	+	+	+	+
3,9	+	+	+	+
1,9	+	+	+	+
0	+	+	+	+

Simbologia

+ crescimento detectado nos tubos
 - sem crescimento detectado

Os resultados da avaliação da CMI do biocida de princípio ativo oxazolidina estão na Tabela 12. Podemos observar que *Rhodotorula* sp. foi o microrganismo mais suscetível a este biocida cujo crescimento foi inibido com 62ppm do biocida. A levedura *C. silvicola* teve seu crescimento inibido com 125ppm. O crescimento dos fungos *Paecilomyces* sp. e *A. fumigatus*. foi inibido a partir de 250ppm, e, 125ppm, respectivamente, mostrando-se menos suscetíveis ao biocida do que as leveduras. Estas concentrações foram apenas capazes de inibir o crescimento destes microrganismos, pois na avaliação da concentração mínima biocida, a atividade esporicida sobre *Paecilomyces* sp. foi a partir de 500 ppm, sobre *A. fumigatus* a partir de 250ppm, e atividade biocida sobre *C. silvicola* a partir de 250ppm, e, sobre *Rhodotorula* sp. a partir de 125ppm ou seja, a atividade biocida, sobre estes microrganismos, foi em concentrações maiores do que a dosagem para a inibição do crescimento.

Tabela 12. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) da oxazolidina diante de *Aspergillus fumigatus*, *Candida silvicola*, *Paecilomyces* sp. e *Rhodotorula* sp.

Concentração do biocida (ppm)	Microrganismo			
	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>A. fumigatus</i>	<i>C.silvicola</i>	<i>Rhodotorula</i> sp
2000	-	-	-	-
1000	-	-	-	-
500	-	-	-	-
250	-	-	-	-
125	+	-	-	-
62,5	+	+	+	-
31,2	+	+	+	+
15,6	+	+	+	+
7,8	+	+	+	+
3,9	+	+	+	+
1,9	+	+	+	+
0	+	+	+	+

Simbologia

+ crescimento detectado nos tubos

- sem crescimento detectado

Na Tabela 13, pode-se observar uma comparação da CMI entre os biocidas testados sobre os microrganismos, e na Tabela 14, a CMB. Ao observar os valores encontrados, pode-se inferir que o biocida isotiazolona seria mais indicado como uma forma química de controle pois nestes ensaios apresentou característica esporicida e biocida sobre microrganismos testados, porém em concentrações inferiores a oxazolidina, que também se mostrou esporicida e biocida. Embora o biocida ditiocarbamato ter apresentado atividade esporostática e esporicida em baixas concentrações sobre os fungos filamentosos, e inferiores aos demais biocidas, não foi eficiente no controle e morte das leveduras.

Tabela 13. Comparação entre as CMI dos biocidas isotiazolona, ditiocarbamato e oxazolidina sobre os quatro microrganismos avaliados.

Microrganismo	Isotiazolona	Oxazolidina CMI	Ditiocarbamato
<i>Paecilomyces</i> sp.	31 ppm	250 ppm	7, ppm
<i>A. fumigatus</i>	15ppm	125 ppm	15, ppm
<i>C. silvicola</i>	125 ppm	125 ppm	+
<i>Rhodotorula</i> sp.	125 ppm	62,5 ppm	+

Simbologia:

+ crescimento foi detectado em todas as concentrações avaliadas

Tabela 14. Comparação entre as CMB dos biocidas isotiazolona, ditiocarbamato e oxazolidina sobre os quatro microrganismos avaliados.

Microrganismo	Isotiazolona	Oxazolidina CMB	Ditiocarbamato
<i>Paecilomyces</i> sp.	62 ppm	500 ppm	7 ppm
<i>A. fumigatus</i>	31 ppm	250 ppm	15ppm
<i>C. silvicola</i>	250 ppm	250 ppm	-
<i>Rhodotorula</i> sp	125 ppm	125 ppm	-

Simbologia:

- não apresentou CMB

A determinação da concentração mínima inibitória revelou que nenhuma das concentrações testadas do biocida formulado a partir de dioxiborinanas foram capazes de inibir o crescimento de nenhum dos quatro microrganismos testados. A partir da determinação da CMI e da CMB, que são orientativas, se optou por excluir da avaliação dos biocidas sobre o crescimento dos microrganismos em misturas de diesel e biodiesel, a dioxiborinana e o ditiocarbamato. A exclusão de ambos se deve ao fato da dioxiborinana não ter efeito nem biocida, nem esporicida em nenhuma concentração avaliada, sobre os microrganismos testados. E o ditiocarbamato foi incapaz de inibir o desenvolvimento das leveduras nas concentrações testadas, sendo por esta razão, eliminado das próximas etapas. Estes biocidas, embora sejam comercialmente indicados para a preservação de combustíveis, foram excluídos das análises seguintes. Na segunda etapa da avaliação da efetividade dos biocidas, a isotiazolona e a oxazolidina foram utilizadas frente a misturas de diesel e biodiesel contaminadas.

4.5.2 Avaliação do biocida sobre o crescimento dos microrganismos em misturas de diesel e biodiesel

4.5.2.1 Isotiazolona

Nas Tabelas 15, 16, 17 e 18 podemos observar o tempo de ação de diferentes concentrações (0, 10, 100 e 300ppm) do biocida isotiazolona testado com os seguintes microrganismos *A. fumigatus*, *Paecilomyces* sp., *C. silvicola* e *Rhodotorula* sp. em diferentes misturas de diesel e biodiesel (B0, B2, B5 e B100). Sobre as leveduras *C. silvicola* e *Rhodotorula* sp. se verificou que a concentração de 10ppm do biocida isotiazolona não foi suficiente para inibir seu desenvolvimento nas misturas de diesel/biodiesel testadas. O mesmo não foi constatado para *A. fumigatus*, aos 15 minutos de avaliação apresentava morte dos esporos nas misturas B0 e B5. Na mistura B100, após 2 horas de contato com 10 ppm de isotiazolona, foi constatada ação esporicida do biocida. Em B2 foi necessário um tempo mínimo de contato de 1 hora para verificar a ação do biocida (10ppm) sobre os esporos. *Paecilomyces* sp. também se mostrou suscetível a ação deste biocida. No entanto, foram necessárias 24 horas de contato entre os esporos e a concentração de 10ppm, nas misturas B2, B5 e B100 para ocorrer ação esporicida; em B0, em apenas 15 minutos de contato observou-se a morte dos esporos. Estes resultados mostram que os esporos fúngicos são mais suscetíveis a baixas concentrações de isotiazolona, do que as células da levedura, que se mostraram resistentes a concentração de 10ppm do produto (0,15ppm de ingrediente ativo).

A concentração de 100ppm de isotiazolona (ou 1,5ppm de ingrediente ativo), recomendada como dosagem preventiva ao crescimento de microrganismos, também foi avaliada. Esta dosagem foi efetiva, logo aos 15

minutos, sobre as células de *Candida silvicola* no diesel puro (B0). Na mistura B5 e em B100, após 30 minutos decorridos do início de contato do biocida com o combustível, foi verificada a inviabilidade celular da levedura. Na mistura B2, somente se observou o início da ação do biocida a 100ppm, após 4 horas de contato deste com a suspensão celular, nesta mistura. A levedura *Rhodotorula* sp. mostrou-se suscetível a concentração de 100ppm, em todas as misturas de diesel e biodiesel, com apenas 15 minutos de contato. Ao analisar a Tabela 16, se observa que os esporos do fungo *A. fumigatus* são suscetíveis à concentração de 100ppm de isotiazolona, e esta foi suficiente para inviabilizá-los após 15 minutos de contato em todas as misturas avaliadas. O mesmo pode ser observado para *Paecilomyces* sp. (Tabela 18), nas misturas B2, B5, B100; na mistura B0, a ação esporicida ocorreu após 30 minutos de contato dos esporos e a concentração de 100ppm.

A dosagem de 300ppm (5ppm de ingrediente ativo) é recomendada para o tratamento curativo de um sistema de armazenamento altamente contaminado por microrganismos. Esta concentração inviabilizou tanto as células de *Candida silvicola* e de *Rhodotorula* sp., quanto os esporos de *A. fumigatus* e de *Paecilomyces* sp., que se mostraram suscetíveis a esta concentração aos 15 minutos iniciais da adição do biocida ao combustível, em todas as misturas oleosas avaliadas.

Tabela 15. Comparação entre os tempos de morte de *Candida silvicola* diante das diferentes concentrações testadas do biocida isotiazolona em diferentes misturas de diesel/biodiesel.

Mistura	B0	B2	B5	B100
Concentração				
0ppm	+	+	+	+
10ppm	+	+	+	+
100ppm	15 min	4h	30min	30min
300ppm	15 min	15 min	15 min	15 min

Simbologia:

+ foi detectado crescimento em todos os tempos avaliados

Tabela 16. Comparação entre os tempos de morte de *Rhodotorula* sp. diante das diferentes concentrações testadas do biocida isotiazolona, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.

Mistura	B0	B2	B5	B100
Concentração				
0ppm	+	+	+	+
10ppm	+	+	+	+
100ppm	15 min	15 min	15 min	15 min
300ppm	15 min	15 min	15 min	15 min

Simbologia:

+ foi detectado crescimento em todos os tempos avaliados

Tabela 17. Comparação entre os tempos de morte de *Aspergillus fumigatus* diante das diferentes concentrações testadas do biocida isotiazolona, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.

Mistura	B0	B2	B5	B100
Concentração				
0ppm	+	+	+	+
10ppm	15min	1h	15 min	4h
100ppm	15 min	15 min	15 min	15 min
300ppm	15 min	15 min	15 min	15 min

Simbologia:

+ foi detectado crescimento em todos os tempos avaliado

Tabela 18. Comparação entre os tempos de morte de *Paecilomyces* sp. diante das diferentes concentrações testadas do biocida isotiazolona, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.

Mistura	B0	B2	B5	B100
Concentração				
0ppm	+	+	+	+
10ppm	15 min	48h	48h	48h
100ppm	30 min	15 min	15 min	15 min
300ppm	15 min	15 min	15 min	15 min

Simbologia:

+ foi detectado crescimento em todos os tempos avaliados

4.5.2.2 Oxazolidina

Os resultados da ação da oxazolidina podem ser observados nas Tabelas 19 e 20. Na Tabela 19 é apresentando o tempo de morte de *Candida*

silvicola diante das diferentes concentrações testadas em diferentes misturas de diesel/biodiesel. A concentração de 100ppm deste biocida foi capaz de inviabilizar as células de *C. silvicola* após 2 horas de contato das misturas B2, B5 e de B0 com o biocida. No biodiesel puro (B100) a dosagem de 100ppm passou a ser efetiva apenas após 24 horas decorridas da adição desta concentração ao combustível. Na Tabela 20 são apresentados os tempos de morte das células de *Rhodotorula* sp., pode-se verificar que 15 minutos de contato, com a concentração de 100ppm foram suficientes para ter ação biocida sobre as células. Na Tabela 21 estão descritos os tempos de morte de *A.fumigatus* diante das diferentes concentrações testadas do biocida Oxazolidina, em diferentes misturas de diesel/biodiesel, em que se observa que ação esporicida iniciou após 24 horas de contato nas misturas B2 e B5, e em B0. Em B100, este tempo de inibição do crescimento iniciou em 6 horas. Outro fungo filamentoso testado, *Paecilomyces* sp., mostrou-se mais suscetível a concentração de 100 ppm do biocida oxazolidina, do que *A. fumigatus*. O tempo de ação sobre os esporos ocorreu após 4 horas de contato, nas misturas B0, B2 e B5, e aos 15 minutos de contato, na mistura B100.

A concentração de 300ppm apresentou efeito biocida sobre as células leveduriformes, tanto para *C. silvicola*, quanto para *Rhodotorula* sp.. em 15 minutos de contato nas misturas B0, B2 e B5, e em B100 (Tabelas 19 e 20). Exceto no diesel puro (B0), a concentração mostrou-se eficaz a partir de 30 minutos de contato, para *Candida silvicola*. A dosagem de 300ppm foi caracterizada como esporicida após 15 minutos de contato (Tabelas 19 e 20). A dosagem de 500ppm foi caracterizada como biocida para *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. após 15 minutos de contato. A ação esporicida, contra os

esporos de *A. fumigatus* e *Paecilomyces* sp. também ocorreu aos 15 minutos de contato a concentração de 500ppm, deste biocida.

Tabela 19. Comparação entre os tempos de morte de *Candida silvicola* diante das diferentes concentrações testadas do biocida oxazolidina, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.

Mistura	B0	B2	B5	B100
Concentração				
0ppm	+	+	+	+
100ppm	2h	2h	2h	24h
300ppm	30 min	15min	15min	15min
500ppm	15 min	15 min	15 min	15 min

Simbologia:

+ foi detectado crescimento em todos os tempos avaliados

Tabela 20. Comparação entre os tempos de morte de *Rhodotorula* sp. diante das diferentes concentrações testadas do biocida oxazolidina, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.

Mistura	B0	B2	B5	B100
Concentração				
0ppm	+	+	+	+
100ppm	15 min	15 min	15 min	15 min
300ppm	30 min	15min	15min	15min
500ppm	15 min	15 min	15 min	15 min

Simbologia:

+ foi detectado crescimento em todos os tempos avaliados

Tabela 21. Comparação entre os tempos de morte de *A.fumigatus* diante das diferentes concentrações testadas do biocida oxazolidina, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.

Mistura	B0	B2	B5	B100
Concentração				
0ppm	+	+	+	+
100ppm	24 horas	24 horas	24 horas	6 horas
300ppm	15 min	15 min	15 min	15 min
500ppm	15 min	15 min	15 min	15 min

Simbologia:

+ foi detectado crescimento em todos os tempos avaliados

Tabela 22. Comparação entre os tempos de morte de *Paecilomyces* sp. diante das diferentes concentrações testadas do biocida oxazolidina, em diferentes misturas de diesel/biodiesel.

Mistura	B0	B2	B5	B100
Concentração				
0ppm	+	+	+	+
100ppm	4 horas	4 horas	4 horas	15min
300ppm	15 min	15 min	15 min	15 min
500ppm	15 min	15 min	15 min	15 min

Simbologia:

+ foi detectado crescimento em todos os tempos avaliados

Ao compararmos o efeito de ambos os biocidas sobre as células de *Candida silvicola*, se pode verificar que a dosagem de 100ppm de isotiazolona foi biocida em um tempo menor (30 minutos), que a mesma dosagem do biocida oxazolidina, em praticamente todas as misturas testadas, exceto em B2 (4horas). O tempo médio para iniciar o efeito biocida do oxazolidina, a dosagem de 100ppm, foi de 2 horas, aumentado para 24 horas em B100. A levedura *Rhodotorula* sp. mostrou-se mais suscetível a ação dos dois biocidas, do que as células de *Candida silvicola*, a concentração de 100 ppm atuou sobre as células em 15 minutos de contato, causando a morte celular em todas as misturas de diesel e biodiesel avaliadas, dos dois biocidas testados.

Sobre a atuação nos esporos fúngicos (*A. fumigatus* e de *Paecilomyces* sp.), a dosagem de 100ppm de isotiazolona se mostrou efetiva em apenas 15 minutos de contato. O efeito biocida de 100ppm de oxazolidina sobre *A. fumigatus* pode ser observado em 6 horas para B100. No entanto, para as outras misturas de diesel/biodiesel observou-se um efeito inibitório após 24 horas. Os esporos de *Paecilomyces* sp. apresentaram-se mais suscetíveis a oxazolidina, a concentração de 100 ppm mostrou-se esporicida após 4 horas de contato nas misturas B0, B2 e B5, e em apenas 15 minutos na mistura B100.

5. DISCUSSÃO

5.1 Crescimento microbiano em misturas de diesel e biodiesel

5.1.1 Curvas de crescimento

Os microrganismos avaliados neste estudo, de uma maneira geral, foram capazes de crescer nas formulações de diesel e biodiesel, utilizando o combustível como fonte de carbono e energia. O crescimento foi avaliado através do peso seco da biomassa formada na interface óleo – água por *A. fumigatus* e *Paecilomyces* sp., e através de UFC.mL⁻¹, para *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. A estimativa da biomassa através da metodologia de peso seco tem sido utilizada em estudos para se determinar o crescimento de microrganismos capazes de utilizar diesel e biodiesel como fonte de carbono e energia, em condições que simulam o armazenamento. Miranda *et al.* (2008) avaliaram o potencial de degradação de óleo diesel de *Candida ernobii* e *Rhodotorula aurantiaca* em experimento com meio mineral e 12% de óleo diesel e estimaram a biomassa pelo método do peso seco, esta mesma metodologia foi utilizada por Bento *et al.* (2005) para o crescimento de *Aspergillus fumigatus* na interface óleo-água em experimento de degradação de óleo diesel, neste mesmo estudo foi realizada a determinação do crescimento de *Candida silvicola* através da contagem de células viáveis. Embora sejam metodologias frequentemente utilizadas, a avaliação do crescimento de microrganismos em combustível também pode ser estimada

através de medida de ATP (adenosina tri-fosfato), proposta por Passmann (2003) no Manual ASTM 47, e utilizada em estudo de biodegradabilidade de biodiesel e de diesel desenvolvido por Passmann (2005). A determinação da concentração de ATP pode ser relacionada a biomassa viável, ou a atividade metabólica, ou a concentração de ATP por células. Além disso, vários métodos são indicados para enumeração de microrganismos degradadores de petróleo e derivados como a estimativa da população através do método do Número Mais Provável (NMP), contagem de heterotróficos, contagem direta por epifluorescência, ensaios lipídicos, indicadores metabólicos e métodos por radioisótopos (Haines *et al.*, 1996; Braddock & Catterall, 1999; Sturman *et al.* apud Singh, 2006).

Os maiores valores de biomassa formada e que representaram diferenças significativas ($p < 0,05$) de crescimento dos dois fungos filamentosos foram as formulações que continham o maior teor de biodiesel, ou seja, B20 e B100, indicando que existe uma relação entre o teor de biodiesel e a produção de biomassa. O ensaio preliminar indicou que as leveduras são capazes de crescer em todas as formulações (B0, B5, B10, B20 e B100), no entanto, na mistura B20 e em B100, o processo de degradação iniciou mais rapidamente, quando comparado às formulações com menos biodiesel, ou somente no óleo diesel. No presente trabalho, utilizou-se o indicador redox TTC (cloreto trifenil tetrazólio), que é reduzido a TPF (trifenil formazan), mas existem outros indicadores de degradação de hidrocarbonetos por microrganismos isolados de diferentes ecossistemas. Entre eles, se pode citar o indicador 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) (Mariano *et al.*, 2007) e o violeta de iodonitrotetrazólio (INT) (Haines, *et al.*, 1996) que são indicados para testes rápidos

de caracterização dos potenciais degradadores de biodiesel ou óleo diesel. O princípio deste teste baseia-se na oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, em que elétrons são transferidos até aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato. Ao incorporar um acceptor artificial de elétrons, como o DCPIP, ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato, pois a oxidação microbiológica dos hidrocarbonetos acarreta na mudança de cor do meio de cultivo, de sua forma reduzida, para sua forma oxidada (Souza, *et al.*, 2005; Mariano *et al.*, 2007, Vieira *et al.*, 2007).

A capacidade de fungos em se desenvolver em diesel metropolitano e meio mineral Bushnell-Haas foi avaliada por Bento & Gaylarde (2001), que constataram o crescimento de *Hormoconis resinae*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida silvicola* nestas condições, a avaliação do crescimento do fungo *Paecilomyces variotii* indicou a incapacidade deste fungo em se desenvolver em tais condições. O fungo *Paecilomyces variotii*, embora não tenha apresentado crescimento significativo em óleo diesel no presente trabalho desenvolveu-se nas misturas de diesel e biodiesel, e ao final dos 60 dias, o maior crescimento foi na mistura B20. Bento *et al.* (2005) avaliaram o crescimento de *Aspergillus fumigatus* em frascos com capacidade para 100mL, que continha 30 mL de meio mineral Bushnell-Hass e 5 mL de óleo diesel, no primeiro mês a produção de biomassa foi similar à obtida no presente trabalho, no entanto, ao final de 60 dias, no trabalho realizado por Bento *et al.* (2005) a biomassa produzida chegou a 60mg. A diferença no crescimento do microrganismo pode estar relacionado às condições de cultivo a que ele foi submetido, e às características da cepa utilizada. Neste estudo, utilizou-se

25mL de diesel/biodiesel e 25mL de Meio Mínimo Mineral, em frascos de 150mL, nestas condições, quando comparado ao estudo de Bento *et al.* (2005), temos uma situação em que a concentração de oxigênio é limitada pela camada de óleo sobre o meio mineral, o que pode ter influenciado no desenvolvimento do fungo. Segundo Passmann (2003), no Manual ASTM 47, o oxigênio é citado como um fator limitante ao desenvolvimento de populações microbianas aeróbias em sistemas de estocagem, porém, ao mesmo tempo, pode favorecer o desenvolvimento de populações anaeróbias, como as bactérias redutoras de sulfato (BRS). Embora a cepa utilizada neste trabalho tenha sido isolada de tanque de armazenamento do óleo diesel, e sua capacidade de utilizar este óleo como fonte de carbono e energia tenha sido constatada, sua manutenção em ágar malte, pode ter provocado a perda da capacidade de degradação. De acordo com a literatura o método escolhido para o armazenamento de cepas de microrganismos tem influência direta na expressão de suas propriedades fisiológicas e bioquímicas, e pode, inclusive, promover alterações genéticas (Abadias *et al.*, 2001).

As condições de cultivo a que um microrganismo é submetido, influenciam diretamente seu crescimento, assim, a disponibilidade de uma fonte de carbono e energia, nutrientes e fatores como pH contribuem significativamente na formação de biomassa se observou no crescimento de *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces* sp. em caldo malte, acompanhado durante 60 dias, indica a influencia das condições de cultivo sobre o desenvolvimento fúngico.

O potencial de degradação de produtos derivados de petróleo, como óleo diesel, querosene, óleo lubrificante e de biodiesel por leveduras, tem sido

investigado entre várias espécies, podendo-se citar os microrganismos pertencentes aos gêneros *Rhodotorula* sp., *Candida* sp. (Bento *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2007; Cruz, *et al.*, 2008), como os mais frequentemente citados na literatura. No presente trabalho, também foi investigado o potencial de leveduras em degradar diesel/biodiesel, neste sentido, verificou-se um aumento da biomassa de ambas as leveduras, nas duas misturas avaliadas, B20 e B100. A capacidade de crescimento em óleo de diesel e meio mineral, por *Candida silvicola* foi avaliada por Bento *et al.* (2005), que verificaram a capacidade da levedura em crescer, utilizando o diesel como fonte de carbono, e verificaram que a produção máxima de biomassa foi 10^8 células mL⁻¹, aos 7 dias de incubação, a partir de uma concentração de 10^2 células mL⁻¹. Miranda *et al.* (2007), acompanharam a formação de biomassa de *Rhodotorula aurantiaca* e *Candida ernobii* durante um período de 20 dias de aclimatação ao óleo diesel (única fonte de carbono e energia), para isso variaram a concentração de óleo diesel de 2% para 12% em meio mineral Busnehl-Hass, constatando ao final do experimento que a biomassa formada por *R. aurantiaca*, foi 4 vezes maior que a biomassa formada por *C. ernobii*. No presente trabalho, a concentração inicial de células foi de 10^4 células mL⁻¹ (contagem em câmara de Neubauer) e verificou-se que *Rhodotorula* sp., atingiu 10^{10} UFC.mL⁻¹ em B100, enquanto *C. silvicola* se manteve em 10^8 UFC.mL⁻¹. Contagem em torno desse valor também foi feita em B20, para *C. silvicola*, e para *Rhodotorula* sp. em torno de 10^7 UFC.mL⁻¹, após 7 dias de cultivo. Embora o acompanhamento do crescimento das leveduras, em meio GYMP, tenha sido feito apenas durante 48 horas, foi possível perceber que em condições em que a fonte de carbono está prontamente disponível para ser incorporada pelo metabolismo dos

microrganismos (como proporcionado pelo meio GYMP), o crescimento populacional de *Candida silvicola* e de *Rhodotorula* sp. ocorreu de forma mais rápida, quando comparada ao crescimento em condições cuja única fonte de carbono e energia foi diesel e biodiesel. Neste sentido a população de *C. silvicola*, em 24 horas, foi estimada em 10^9 UFC.mL⁻¹, e a população de *Rhodotorula* sp. em torno de 10^8 UFC.mL⁻¹.

5.1.2 Fase aquosa

O objetivo de acompanhar as modificações nas medidas de tensão superficial da fase aquosa oriunda do crescimento microbiano na presença de óleo diesel foi de detectar a produção de compostos com ação surfactante, a o acompanhamento através do índice de emulsificação (IE 24%), foi realizado para se detectar a produção de compostos com ação emulsificante. Ambas são utilizadas para detectar-se a produção de biossurfactantes pelos microrganismos. Ao reduzir a tensão superficial e emulsificar, e promover a solubilização dos hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilita o crescimento dos microrganismos nestes substratos (Desai & Banat, 1997; Banat *et al.*, 2000; Mulligan, 2005; Singh *et al.*, 2007). Neste sentido, os biossurfactantes podem afetar a velocidade de biodegradação de hidrocarbonetos de duas formas: (i) aumentando a solubilização nas moléculas na fase aquosa, e (ii) modificando a afinidade entre as células dos microrganismos e os hidrocarbonetos, ao aumentar a hidrofobicidade celular (Luis *et al.*, 2000; Mehdi & Giti, 2008; Paria, 2008). Dessa forma, as moléculas biossurfactantes estão envolvidas no processo de disponibilização de substratos insolúveis para a célula (Luis *et al.*, 2000; Mulligan, 2005; Singh *et al.*, 2007; Paria, 2008).

A redução da tensão superficial das fases aquosas pode estar relacionada a presença de ésteres de ácidos graxos (Biodiesel) nos tratamentos, devido a semelhança entre sua estrutura química com a estrutura de alguns tipos de surfactantes, uma vez que os surfactantes possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados à uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (Cameotra *et al.*, 1998; Bognolo, 1999). Neste sentido, os ésteres de ácidos graxos podem formar associações ordenadas na interface óleo água e assim reduzirem a tensão superficial, tal qual um surfactante (Nitschke & Pastore, 2002).

Neste trabalho, os ensaios com *Candida silvicola* e com *Rhodotorula* sp. apresentaram microemulsões na fase oleosa, em B100, embora não se tenha obtido resultados de emulsificação com o IE 24%. Essas microemulsões indicam que as leveduras podem produzir alguma molécula com capacidade de emulsificação. Embora se tenha observado redução das medidas de tensão superficial, em B100 de $53,8\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para $35,3\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, para *Candida silvicola*; e, para $36,9\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, para *Rhodotorula* sp., e os resultados tenham apontado diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($43,5\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$), a redução da tensão superficial e a emulsificação da fase oleosa, podem estar relacionadas a um composto produzido pelas leveduras em B100, ou pode estar associado a composição do biodiesel. A produção de biosurfactantes por algumas espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Candida* tem sido relatada e estudada utilizando óleos de origem vegetal (Thanomsub *et al.*,

2004; Ilori *et al.*, 2008) e indicando a capacidade de emulsificação da fase oleosa, característica atribuída aos surfactantes de alto peso molecular, chamados de bioemulsificantes, formados por polissacarídeos, não apresentando a composição anfipática, ou seja, uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. No meio aquoso estes bioemulsificantes, são responsáveis pela formação e estabilidade da emulsão, porém não causam necessariamente a redução da tensão superficial. (Bento *et al.*, 2008). DeMello *et al.*, 2007 conduziram experimentos para comparar o óleo diesel com misturas de diesel e biodiesel, em relação a capacidade de promover a dispersão da fase oleosa ou exibir estabilidade de emulsões da fase oleosa, e verificaram que os ésteres de ácidos graxos aumentam a estabilidade de pequenas gotas de óleos na água ao diminuir a tensão superficial da água e, conseqüentemente, reduzindo sua re-agregação.

De uma forma geral, não foram observadas reduções significativas das medidas de tensão superficial, ao compararmos os tratamentos na presença do fungo *A. fumigatus* e *Paecilomyces* sp. e seus respectivos tratamentos controle (em que não houve inoculação do fungo). O tratamento controle foi utilizado para a comparação com os tratamentos em que os fungos foram inoculados, considerando-se que podem ocorrer alterações por fatores abióticos, tanto na fase aquosa quanto na fase oleosa. A maior redução ocorreu aos 7 dias de incubação, no tratamento B0, na presença de *Aspergillus fumigatus*, em que o controle apresentou a medida de $51,5\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, e o tratamento com o fungo apresentou a medida de $39,7\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, indicando a produção de algum composto com características de reduzir a tensão superficial. Porém, nos demais tempos, as medidas foram semelhantes entre o

tratamento com o fungo, e sem o fungo. Ao final dos 60 dias, a medida de tensão superficial do tratamento foi de $50,6\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, e do controle, foi de $48,4\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Lemos & Pereira (2004), avaliaram a produção de tensoativos, realizada com inóculo fúngico de *Aspergillus niger* e *Penicillium corylophilum*, em três formulações de meio mineral, contendo óleo de soja. Após 30 dias, obtiveram valores diferentes nas medidas de tensão superficial para cada meio testado, para ambos fungos, e *P. corylophilum* foi capaz de reduzir a tensão superficial a um valor inferior a $40,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, atingindo o valor de $36,2\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, no meio mineral em que fora adicionado extrato de levedura. Tanto neste trabalho, quanto no estudo desenvolvido por Lemos & Pereira (2004), os fungos avaliados não demonstraram capacidade de produção de biossurfactantes, quando a única fonte de carbono foi o óleo diesel, ou, neste trabalho, misturas de diesel e biodiesel. Vários fatores podem influenciar os valores de medidas de tensão superficial, algumas substâncias do meio de cultura, como a peptona ou solventes como o metanol ou etanol, podem reduzir a tensão superficial na ausência de um surfactante (Miller & Zhang, 1997).

Embora não tenha sido observada uma redução significativa das medidas de tensão superficial, em comparação ao tratamento com o fungo e seu controle, sem o fungo, observou-se que aos 21 dias de cultivo de *A. fumigatus*, nos tratamentos na presença de biodiesel, houve uma redução das medidas para valores inferiores a $40,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, tanto na presença quanto na ausência do fungo. Os menores valores foram nos tratamentos B10 e B20, no tratamento controle, atingindo o valor de $34,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, em B100. No ensaio realizado para *Paecilomyces* sp. pôde-se observar um comportamento similar, ou seja, em tratamentos controle, a medida da tensão superficial foi inferior ao

tratamento em que o fungo estava presente, indicando que nas condições de cultivo utilizadas no experimento, a cepa do fungo *A. fumigatus* e do fungo *Paecilomyces* spp não produziram biossurfactantes. As medidas de tensão superficial, nos experimentos de crescimento em caldo malte, foram bem diferentes, o tratamento controle apresentou a medida de $51,0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, ao final de 60 dias, na presença de *Aspergillus fumigatus* a medida de tensão superficial foi de $61,4\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, e no tratamento com *Paecilomyces* sp., ocorreu a redução para $28,5\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

O biodiesel tende a sofrer alterações nas suas propriedades ao longo do tempo devido a reações de natureza hidrolítica e oxidativa com o meio ambiente. O processo de degradação oxidativa, também conhecido como rancificação oxidativa, ocorre com o biodiesel proveniente de plantas oleaginosas, por ser composto por ésteres de ácidos graxos insaturados (linoléico e linolênico) que são sensíveis à oxidação (Dunn, 2005; Liang *et al.*, 2006; Cavalcanti, 2007, Leite *et al.*, 2007). Esses ésteres sob influência de condições abióticas como calor, radiação UV, umidade, ar atmosférico e metais, mesmo que por pouco tempo, induzem o biodiesel ao processo oxidativo, formando radicais livres, combinação com oxigênio, formação e clivagem de peróxidos nas insaturações, liberação de aldeídos, ácidos carboxílicos e polímeros (Knothe, 2007). Neste sentido, o controle de qualidade do biodiesel leva em consideração o índice de acidez do produto que revela o estado de conservação do óleo, definido como o número de mg de KOH necessário para neutralizar os ácidos livres de 1 grama da amostra. Neste estudo o pH foi um dos parâmetros utilizados para acompanhar o crescimento dos microrganismos no meio óleo diesel, misturas de diesel e biodiesel e

somente biodiesel, e também foi acompanhada nos tratamentos denominados controles, a fim de se verificar a elevação da acidez no meio aquoso devido a fatores abióticos. A presença de compostos com características ácidas em um tanque de armazenamento pode comprometer a qualidade final do combustível, além de levar a corrosão interna dos tanques.

Nos ensaios de crescimento com *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces* sp. após 60 dias de incubação não se observou uma redução significativa das medidas de pH. *Aspergillus fumigatus* é citado como um fungo deteriorogênico de combustíveis e conhecido pela redução do pH da fase aquosa, pois durante a degradação dos hidrocarbonetos há formação de metabólitos, que podem provocar a redução da medida do pH na fase aquosa (Bento & Gaylarde, 2001; Passmann, 2003; Bento *et al.*, 2005). Além dos produtos metabólitos formados durante o crescimento em hidrocarbonetos, a redução do pH pode estar relacionada a lises celulares, produtos poliméricos e ácidos orgânicos (Parbery, 1970). Bento *et al.* (2005) verificaram em ensaio com óleo diesel e meio mineral Bushnell- Hass, com o fungo *Aspergillus fumigatus*, a redução das medidas de pH da fase aquosa, após 60 dias de incubação, de 7,0 para 4,8, a autora detectou a presença de uma série de metabólitos, como álcoois e cetonas, além de ácidos, como o ácido propiônico na fase aquosa, através da técnica de microextração da fase sólida. Santos *et al.* (2007) correlacionaram o aumento da acidez do óleo bruto de dendê, durante seu armazenamento, a presença do fungo *Paecilomyces variotii*, indicando que este fungo é capaz de biotransformar o óleo e gerar ácidos graxos livres. Nos ensaios de crescimento das leveduras *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. as medidas de pH também não reduziram de forma

significativa, ao final de sete dias de incubação, em meio mínimo mineral e 1% de B20 ou B100. Miranda *et al.* (2007) avaliaram o potencial de degradação de óleo diesel por leveduras (*Rhodotorula aurantiaca* e *Candida ernobii*), antes de proceder aos ensaios de biodegradação as leveduras foram submetidas a aclimatação ao óleo diesel (única fonte de carbono e energia), para isso variaram a concentração de óleo diesel de 2% para 12% em meio mineral Bushnell-Hass, em um período de 20 dias. Durante essa fase, o crescimento das leveduras foi avaliado, e a medida de pH da fase aquosa, aos 7 dias de cultivo, ficou em torno de 6,8 para as duas leveduras. Neste trabalho, tanto para *Candida silvicola* quanto para *Rhodotorula* sp. em B100, a medida de pH ficou em torno de 6,7; e, em B20, 6,8 para *C. silvicola* e 7,0 para *Rhodotorula* sp. Na avaliação do crescimento em caldo malte, ao final de 60 dias observou-se que o pH do meio variou de 5,4 para 6,1, na presença de *Aspergillus fumigatus*; de 5,4 para 7,9, na presença de *Paecilomyces* sp. E a variação nas medidas do pH do meio, devido ao crescimento das leveduras no meio GYMP, foi a seguinte: na presença de *Rhodotorula* sp. foi de 7,2 para 6,7; e na presença de *Candida silvicola* foi de 7,2 para 6,7, ao final de 48 horas.

Como a variação do pH foi muito pequena para todos os microrganismos, e foi comprovado crescimento (aumento de biomassa), sugere-se a ocorrência de baixa concentração de metabólitos ácidos ou a possibilidade de tamponamento do meio. Bento (2001) testou o efeito tampão do meio mineral com fosfatos (KH_2PO_2 e K_2HPO_4) presentes no meio mineral Bushnell-Hass, e observou o efeito tamponante da solução, através da adição de concentrações crescentes de um ácido (HCl 0,1N) e de uma base (NaOH 0,1N), verificando que para ocorrer variação, de 7, 2 para 6,4, foi necessário a

adição de 1 mL de HCl (0,1 N) em 50 ml de meio Bushnell-Hass. Para avaliar o efeito tamponante dos fosfatos presentes no Meio Mineral M1, utilizado nos experimentos deste trabalho, conduziu-se um ensaio conforme sugerido por Bento (2001). Desta forma o poder tamponante do meio mineral utilizado neste estudo pode ser visualizado na Tabela 5. Para haver uma redução no pH do meio mínimo mineral de 7,1 para 6,7, foi necessário adicionar 0,2 mL de HCl a 1N. A concentração de fosfatos do Meio Mineral M1 é de $4,45 \text{ g.L}^{-1}$. Neste trabalho a produção de ácidos pelos microrganismos, pode ter sido mascarada pelo poder tamponante do meio Mineral M1, da mesma forma, caso tenha ocorrido a formação de ácidos, por um processo de degradação abiótica (nos tratamentos controles), o efeito de redução do pH também pode ter sido influenciada pela presença dos fosfatos no meio mineral.

5.1.3 Fase oleosa

A degradação microbiana dos ésteres de ácidos graxos depende da interação de uma variedade de parâmetros como: composição do biodiesel, temperatura, aporte de nutrientes, demanda de oxigênio, microrganismos com potencial de degradação. A biodegradabilidade de biodiesel tem sido relatada na literatura e citada como uma característica positiva deste combustível de fontes renováveis de energia. Desta forma, DeMello *et al.* (2007), em estudo sobre o comportamento de biodiesel e misturas de diesel e biodiesel em um ambiente marinho, avaliaram os efeitos abióticos e da população microbiana sobre a degradação dos ácidos graxos e dos hidrocarbonetos em experimento com água do mar e B100, ou B8, B25 ou somente diesel, durante 53 dias de experimento. Os ésteres de ácidos graxos, das amostras contendo somente B100, degradaram a um percentual inferior a 10% de sua massa original, em

três semanas de avaliação. Os controles das amostras (montados com água do mar autoclavada), não apresentaram mudanças na massa de ésteres de ácidos graxos durante o tempo de avaliação (53 dias). Zhang *et al.* (1998) verificaram uma alta biodegradabilidade de biodiesel, em estudo sobre o comportamento de degradação em ambiente aquático, utilizando um inóculo constituído de águas residuais (esgoto), matéria orgânica de solo. Além disso, constataram um percentual de degradação de ésteres acima de 90%, em 28 dias. Em um mesmo período de avaliação (4 semanas) Pasqualino *et al.* (2006), observaram um percentual de 98% de degradação do biodiesel utilizando um inóculo proveniente de lodo ativado, de uma estação de tratamento de esgoto.

O fungo *Aspergillus fumigatus* é um importante contaminante do óleo diesel, com um papel importante na formação de biomassa na interface óleo/água (Bento & Gaylarde, 1996; Bento & Gaylarde, 2001), e é citado por Bento *et al.* (2005) como degradador de óleo diesel. A formação de biomassa de *A. fumigatus* ocorreu de forma significativa, em B100, aos 7 dias de avaliação, mantendo-se praticamente constante até o final dos 60 dias. Assim, os valores de degradação encontrados, poderiam estar relacionados ao desenvolvimento da biomassa nos primeiros dias da avaliação. *Paecilomyces variotti*, citado por Santos *et al.* (2007), foi encontrado como um importante contaminante do óleo de dendê bruto, durante seu armazenamento, porém, não foram encontrados na literatura citações sobre degradação de combustíveis por fungos do gênero *Paecilomyces* sp. Embora este fungo tenha apresentando contínua formação de biomassa, ao longo dos 60 dias, apresentou baixas taxas de degradação. Neste sentido, os valores encontrados podem estar relacionados ao fato da degradação final estar relacionada com os

valores de degradação dos ésteres de ácidos graxos encontrados nos tratamentos controles, ou seja, os tratamentos sem a adição de inóculo, em também foi observada a degradação de ésteres de ácidos graxos. A estabilidade dos componentes dos ácidos graxos é influenciada por fatores como a presença de ar, calor, metais, peróxidos, luz, e a próprias características estruturais dos componentes, como a presença de pontes duplas de ligação (Knothe, 2007) Dependendo da matéria-prima, o biodiesel pode conter mais ou menos ácidos graxos insaturados em sua composição, assim, óleos vegetais ricos em ácidos oléicos (C18:1), linoléicos (C18:2) e linolênicos (C18:3), como o óleo de soja, conferem ao combustível uma baixa estabilidade a oxidação, devido a presença destas cadeias insaturadas. Cadeias de ésteres de ácidos graxos que apresentam ligações insaturadas, tem menor estabilidade oxidativa, influenciando diretamente na degradação do combustível. Além disso, quando a água está presente em um sistema de estocagem pode ocorrer a decomposição hidrolítica do biodiesel, liberando ácidos graxos livres no sistema, o que por sua vez eleva o índice de acidez do produto estocado, tornando-o ainda mais instável (Schleicher *et al.*, 2009). Em estudo sobre a degradação de biodiesel em diferentes situações de armazenamento, alterando fatores como temperatura, exposição ao ar e presença de água, Leug *et al.* (2006) constataram que a presença de água tende a aumentar a degradação do biodiesel, através da hidrólise, embora os outros fatores associados tenham efeitos maiores sobre a degradação. Assim a presença da água livre acarreta numa série de processos degradativos além de promover o estabelecimento de uma biomassa na interface óleo água, de fungos, como observado neste trabalho.

Outro fator que pode ser relacionado as baixas taxas de degradação pelos fungos filamentosos, neste trabalho, em relação aos trabalhos realizados por Zhang *et al.* (1998), Pasqualino *et al.* (2006), DeMello *et al.* (2007) é o inóculo utilizados nos trabalhos. A diversidade dos microrganismos utilizados nos trabalhos citados é extremamente alta, e provem de locais em que a microbiota está em contato com diversificadas fontes de carbono, o que pode favorecer a degradação do combustível. Neste caso pode-se inferir que possa ocorrer cometabolismo das atividades de degradação, onde espécies são responsáveis (competentes enzimaticamente) pela degradação inicial de um determinado substrato, disponibilizando-o para outras espécies que são incapazes de degradar. Trata-se de uma relação complementar de atividade metabólica, onde uma população disponibiliza para outra o substrato (Alexander, 1994).

As maiores taxas de degradação foram as apresentadas pelas leveduras. Leveduras do gênero *Candida* e *Rhodotorula*, são citadas na literatura como contaminantes de óleo diesel, e também como degradadoras de frações de hidrocarbonetos que o compõem (Bento *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2007). *Candida silvicola* apresentou a completa mineralização dos ácidos graxos ao final de sete dias. Em estudo realizado por Owsianiak *et al.* (2009), utilizando um consórcio de bactérias isoladas de um local contaminado por óleo, foi observado completa mineralização dos metil-ésteres em misturas 50% de biodiesel, ou mais, de diesel.

Pode-se observar que a fração C16 foi degradada por todos os microrganismo avaliados. Neste sentido, Miller e Mudge (1997) também observaram que alguns ésteres metílicos de ácidos graxos (C18) insaturados

eram degradados mais rapidamente do que os ésteres metílicos de ácidos graxos saturados, em experimentos que focavam determinar a efetividade do biodiesel na remediação de derramamentos de óleo cru no meio ambiente. Lalman & Bagley (2001) concluíram em seu trabalho que a degradação de ácidos insaturados (como linoléico e oléico) é mais favorável energeticamente do que para ácidos saturados. DeMello *et al.* (2007), no entanto, observaram que os ésteres de ácidos graxos C16 (ácidos saturados) eram degradados mais rapidamente do que os ésteres de ácidos graxos C18. Além de observar as cadeias preferencialmente degradáveis, também pode se verificar que ao final da avaliação pode ocorrer a formação de outros ácidos como Ácido Palmítico, Esteárico, Oléico e Linoléico como produtos de degradação ou de metabolismo bacteriano (Vieira *et al.*, 2007).

5.2 Controle do crescimento de microorganismos em misturas de diesel e biodiesel

Como constatado neste trabalho, a adição de biodiesel aumenta a formação de biomassa na interface óleo água. Os problemas que essa biomassa formada podem causar incluem o entupimento de bombas injetoras e filtros nos motores, formação de sedimentos no tanque de armazenamento, além de comprometer a qualidade final do combustível. Neste sentido, uma forma de evitar tais problemas está relacionada com a avaliação de biocidas para combustíveis. A demanda pelo uso de biocidas está associada a garantia de qualidade dos produtos industriais (Fairbanks, 2001, 2008). Segundo Zaporali (2005) uma expectativa de vendas no setor de biocidas seria para a preservação durante a estocagem de biodiesel.

A escolha por um determinado biocida, não está relacionada somente a concentração a ser aplicada. Algumas características definem um biocida ideal para combustíveis, como estabilidade química e térmica; atividade biocida em concentrações que não afetem a qualidade do combustível, afim de mantê-lo dentro das especificações, e que não danifique bombas, motor; apresentar compatibilidade química e física com o combustível e outros aditivos; ser biodegradável, atuar sobre amplo espectro de microrganismos; ter boa solubilidade em água e no óleo, e apresentar boa relação entre custo-benefício da aplicação ao consumidor (Gaylarde, 1995; Gaylarde *et al.*, 1999; Chelossi & Faimali, 2006; Yemashova *et al.*, 2007). No entanto, dificilmente será encontrado um biocida que atenda a todas essas características, por isso, o critério de seleção de um biocida deve ser rigoroso, de forma que ele apresente a efetividade necessária, atendendo a maioria das qualidades listadas. Dependendo da finalidade de uso dos biocidas, eles devem ser capazes de eliminar diversos de microrganismos como bactérias (bactericida), fungos (fungicida) e algas (algicida). Esta exigência fez com que aparecesse, no mercado, o conceito de polivalência dos biocidas, pois um composto químico pode ter ação sobre bactérias, mas não necessariamente sobre fungos e/ou algas (Gaylarde, 1995; Bento, 2001; Passmann, 2003). No Manual ASTM-47 (Passmann 2003), é apresentada uma lista de microbiocidas aprovada pela Agência de Proteção Ambiental Americana, para uso em combustível, que apresenta uma variada composição, oferecendo ao consumidor o mais apropriado ao sistema a ser tratado.

As concentrações mínimas biocida e mínima inibitória direcionam a aplicação do biocida quanto a concentração de modo que não seja aplicado em

concentrações acima das necessárias, ou numa concentração que não seja suficiente para controlar o desenvolvimento das populações (ANVISA, 2002; Chelossi & Faimali, 2006; Cury *et al.*, 2007). As concentrações obtidas neste trabalho através da CMI e da CMB mostraram-se eficientes no controle dos microrganismos, quando aplicadas junto as diferentes formulações de diesel e biodiesel, indicando que a determinação do perfil de suscetibilidade dos microrganismos, através desta metodologia, pode servir de orientação para o controle de populações em tanques de armazenamento. No entanto, como os valores da CMI e CMB, são determinados a partir de meios de cultura ricos em nutrientes, utilizando-se organismos de laboratório, nem sempre as concentrações obtidas podem não ser aquelas necessárias para controlar a população em outras condições no ambiente real (Gaylarde, 1995; Chelossi & Faimali, 2006). Neste sentido, a concentração de biocida requerida para controlar o crescimento de microrganismos é afetada pela própria substância a ser tratada, pela natureza de seus componentes, e nas condições que o biocida deverá agir (Chelossi & Faimali, 2006). A ação dos biocidas difere também em relação a vários gêneros de microrganismos devido aos mecanismos de ação do biocida, como se pode verificar com os testes de CMB e CMI. Então estes testes apenas orientam a faixa de suscetibilidade do microrganismo aos seus ingredientes ativos, indicando a necessidade de investigar a população de cada sistema e ver sua suscetibilidade ao biocida a ser aplicado, a fim de evitar que dosagens muito altas sejam utilizadas, ou mesmo concentrações que não tenham eficácia sobre o sistema contaminado. Neste sentido, uma medida a ser adotada é um constante monitoramento em tanques de armazenamento, para se verificar se o biocida e o regime de

tratamento adotado são eficientes, não somente logo após o processo de descontaminação, mas também em intervalos regulares a fim de se verificar o momento em que a aplicação deve ser retomada (Gaylarde, 1995; Passmann, 2003).

Um das exigências de um bom biocida que se pode ressaltar é com relação ao coeficiente de partição (ou seja, solubilidade em água e no óleo), pois apresenta um papel importante em dois aspectos, velocidade de efetividade e tempo de preservação. O coeficiente de partição de um biocida, descreve a afinidade que o biocida tem pela fase combustível ou pela fase água. Um biocida que tem alto coeficiente de partição, pode favorecer a fase combustível mais do que a fase aquosa e o de baixo coeficiente de partição (maior afinidade pela água), pode atuar mais na fase aquosa que no combustível (Dorris & Pitcher, 1988). Por isso, a avaliação da efetividade dos biocidas em um sistema contendo uma fase aquosa e uma fase oleosa, e contaminado por uma população microbiana, como montado neste trabalho, tornam-se imprescindíveis para se determinar a eficácia do produto.

O biocida isotiazolona vem sendo investigado com relação a sua efetividade a baixas concentrações com microrganismos isolados de óleo diesel contaminado, desde 1992. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os encontrados na literatura. Bento & Gaylarde (2001) em uma avaliação em laboratório de diferentes concentrações do biocida isotiazolona, observaram que 1 e 10 ppm de ingrediente ativo foram capazes de prevenir o crescimento de microrganismos em meio Bushnell-Hass e óleo diesel, até 450 dias. No presente trabalho a concentração de 1,6ppm (ou 100ppm do produto) se mostrou eficiente, prevenindo o crescimento dos quatro

microrganismos, inviabilizando as células e os esporos após 15 minutos de contato, em quase todas as misturas de combustível avaliadas. A concentração de 5 ppm (ou 300ppm do produto) inviabilizou as células e os esporos após 15 minutos, em todas as misturas. A concentração mínima biocida sobre os esporos de *Aspergillus fumigatus* foi de 250ppm. No estudo de Bento & Gaylarde (2001) a levedura *Candida silvicola* foi caracterizada como um dos microrganismos mais sensíveis as concentrações de 1 e 10ppm (ou 60 e 600 ppm do produto, respectivamente). Tal suscetibilidade a essas concentrações também foi verificada no presente trabalho.

No entanto, no presente trabalho, a concentração de 0,16ppm (ou 10ppm do produto) foi considerada esporicida pois detectou-se a inviabilidade dos esporos fúngicos, em no máximo 4 horas para *A. fumigatus*, e em até 48 horas para *Paecilomyces* sp. No entanto, os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Hormoconis resinae* no trabalho desenvolvido por Bento (2001), foram caracterizados como mais resistentes, sugerindo uma maior concentração e tempo de contato do biocida para a inviabilidade do esporo. O biocida oxazolidina de uma forma geral foi eficiente na inviabilização das células de leveduras e sobre os esporos fúngicos, porém em sua eficiência esporicida ou biocida foi observada após um maior período de contato com os esporos e células (quando se compara a atuação de ambos biocidas na concentração a 100ppm). Os mecanismos precisos da ação esporicida tem sido pouco estudados e podem envolver a interação de um ou mais sítios dentro da membrana (capa que envolve o esporo), o córtex ou o protoplasma do endósporo ou esporo. Em geral, o mecanismo inicial de ação dos biocidas em relação ao esporo e a célula da levedura é correspondente ao das células

vegetativas, com o comprometimento da superfície celular, através de reações específicas com grupos tiol (-SH) presentes em proteínas (cisteína) da membrana celular, inativando ou inibindo a síntese de esteróis (Bento, 2001). Um biocida é considerado efetivo quando é capaz de atravessar o envoltório celular e provocar danos irreparáveis, como a perda de constituintes celulares (Diehl & Chapman, 1999).

O tratamento de tanques de armazenamento com biocidas, para evitar a contaminação microbiana ou para erradicar uma população estabelecida, pode ser efetivo, mas exige um cuidado relacionado ao descarte da água de lastro, por exemplo, após o tratamento. Além do descarte da água, podem ocorrer acidentes, como derramamento de óleo, tanto no solo como em corpos de água, disponibilizando o biocida no ambiente. Os biocidas podem ser degradados por fatores químicos ou físicos (pH, temperatura), biológicos (atividades enzimática) (Gaylarde, 1995). No entanto, quando o biocida não apresenta uma rápida degradação no ambiente (em compostos não tóxicos), sem uma rápida dispersão no ambiente que resulte em uma baixa biodisponibilidade aos organismos não alvo, apresente mínima toxicidade e níveis mínimos de bioacumulação aos organismos não alvo, (Jacobson & Williams, 2000; Chelossi & Faimali, 2006), pode ocorrer sérios danos ambientais. Quando não ocorre a inativação do produto conforme previamente indicado em informes técnicos fornecidos pela empresa produtora do biocida, a presença de resíduos do biocida no ambiente, pode resultar na diminuição da suscetibilidade ou resistência dos microrganismos aos ingredientes ativos dos biocidas (Gaylarde 1995, Russel, 2003; Cloete, 2003). Neste sentido, deve haver uma preocupação quanto a biodegradabilidade do produto ou

desenvolver produtos que tenham a capacidade de desativar o ingrediente ativo presente no biocida, como a aplicação de nucleófilos como o metabissulfito de sódio que atacam as isotiazolonas, resultando em sua clivagem em ácido alquil- malonâmico, um composto inerte (Jacobson & Williams, 2000).

Os trabalhos de avaliação da efetividade de biocidas sobre espécies isoladas, contribuem para o conhecimento da suscetibilidade de determinados grupos microbianos. No entanto, em tanques contaminados, ou seja, em um sistema real, temos a presença de um biofilme já estabelecido (maduro) na superfície dos tanques e na interface óleo/água, produtos de corrosão e outras substâncias (orgânicas e inorgânicas) decorrentes do crescimento microbiano. A utilização de biocida, neste caso, deve contemplar a presença de um sistema mais complexo com muitas interações a considerar na escolha da concentração..

6. CONCLUSÕES

Os maiores valores de biomassa formada pelo crescimento dos dois fungos filamentosos foram as formulações que continham o maior teor de biodiesel, ou seja, B20 e B100, indicando que existe uma relação entre o teor de biodiesel e a produção de biomassa, indicando que a presença do biodiesel nas misturas testadas aumenta a suscetibilidade do combustível a contaminação e crescimento microbiano.

As medidas de tensão superficial e o índice de emulsificação não se mostram adequados para determinar a produção de biossurfactantes, indicando que nas condições estabelecidas, provavelmente não houve produção de biossurfactantes pelos fungos filamentosos. No entanto, as leveduras podem ter produzido algum composto com características surfactantes.

Não foram observadas reduções significativas nas medidas de pH na presença dos microrganismos.

Candida silvicola apresentou maior capacidade de degradação do biodiesel puro (B100).

As concentrações determinadas por Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Biocida (CMB) foram eficazes no controle do crescimento dos quatro microrganismos, em meio mineral com as diferentes composições do combustível testadas.

7. PERSPECTIVAS

Realizar ensaios de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para avaliar a biodeterioração dos hidrocarbonetos, do óleo diesel, e dos ésteres de ácidos graxos do biodiesel em B0, B5, B10 e B20, caracterizando a fração consumida pelos microrganismos.

Avaliar a produção de enzimas que possam estar envolvidas no processo de degradação do biodiesel.

Investigar a produção de biossurfactantes pelas leveduras.

Caracterizar ao nível de espécie os microrganismos *Paecilomyces spp.* e *Rhodotorula spp.* que apresentaram capacidade de crescimento significativo nos sistemas estudados por técnicas de biologia molecular.

Isolar e identificar, por técnicas de biologia molecular, microrganismos de borras formadas em tanques de armazenamento das misturas de diesel e biodiesel, e quantificar genes que estão relacionados com a biodegradação do biodiesel.

Avaliar o efeito da degradação de hidrocarbonetos (policíclicos aromáticos e alcanos) em presença de biodiesel.

Investigar metabólitos produzidos pelo metabolismo de microrganismos, que apresentem capacidade de degradação do combustível, e que possam acarretar danos ao tanque de armazenamento e as peças do veículo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M. *et al.* Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.64, n.6, p. 856-61, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Anuário Estatístico – 2007**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/conheca/anuario_2007.asp>. Acesso em: 06 jan. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. **NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 -1898, Estados Unidos, 2002.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. 1.ed. San Diego: Academic Press, Califórnia, 1994, 302p.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. 4. ed., 1996, 640p.

BAKANAUKAS, S. Bacterial activity in JP-4 fuel. Wright air development centre technical report 58,44, armed. **Services Technical Information Agency Document N° 151044**, p.1 -15, 1958.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BARNETT, H. H. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 2. ed. Burgess Publishing Company, 1960, 225p.

- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts, Characteristics and Identification**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 1139p.
- BATTS, B.D.; FATHONI, Z.A. A literature Review on Fuel Stability Studies with Particular Emphasis on Diesel Oil. **Energy & Fuels**, Washington, v.5, n. 1, p.2-21,1991.
- BENTO, F, M. **Biocorrosão do aço ASTM A283-93 em sistemas diesel água e o efeito de um biocida**. Porto Alegre: UFRGS, 2001, 192p. (Tese de Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- BENTO, F, M.; GAYLARDE, C.,C. Effect of additives on fuel stability - a microbiological study. In: SIMPOSIO LATINO AMERICANO DE BIODETERIORACAO, 3.,1998, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: SLAB, 1998. p. 45.
- BENTO, F. M. *et al.* Microrganismos e o armazenamento de óleo diesel. **Revista Petroquímica Petróleo, Gás & Química**, Rio de Janeiro, v. 211, p. 70-77, 1999.
- BENTO, F. M. *et al.* Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel á contaminação microbiana durante a estocagem. **Revista Biodiesel**, São Paulo, v. 4, p. 24-26, 2006.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 47, n. 2, p. 107 -112, 2001.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C.C. Microbial contamination of stored diesel oil. Brazilian. **Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 3, p. 71-75, 1996.
- BENTO, F.M. *et al.* Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Oxford, v.21, n. 2, p. 135 -142, 2005.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O., GAYLARDE, C.C. Biossurfactantes. In. Melo, I.S.; Azevedo, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008, p.151 -184.

BIANCO, H.; MAESTRI, J.P.; JUNIOR, L.C. **Apostila Kit – Curso de óleo diesel**, Petrobras Distribuidora S.A. 88p. 1998.

BIODIESEL: Handling and Use Guidelines. U.S. Department of Energy Efficiency and Renewable Energy- DOE; GO – 102004 -1999. Out. 2004, 60 pg.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 41-52, 1999.

BRADDOCK, J.F., CATTERALL, P.H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.3, p.81-84, 1999.

BRASIL. Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 jan. 2005. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br>> Acesso 06 de jan. 2009.

BRUCE, N. A laboratory study of microbial growth in simulated fuel tanks. **International Biodeterioration Bulletin**, Birmingham, v.18, n.3, p.87-91, 1982.

BUSHNELL, C.D.; HAAS, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.41, p.654-674, 1941.

CAMEOTRA S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 50, n. 5, p. 520-529, 1998.

CAMPO, P. *et al.* Biodegradation kinetics and toxicity of vegetable oil triacylglycerols under aerobic conditions. **Chemosphere**, Oxford, v. 68, n. 11, p. 2054-2062, 2007.

CAVALCANTI, E. H. S. *et al.* Controle da estabilidade oxidativa de biodiesel de soja através de mistura de aditivos antioxidantes. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Artigos técnico-científicos eletrônicos...** Brasília: Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007. Disponível em <http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamentoll.htm> . Acesso em: 21 jan. 2009.

CHAPELLE, F. H . **Ground-water microbiology and geochemistry**. 2. ed. New York: John Wily & Sons, 2001. 477 p.

CHAPMAN, J. S. Biocide Resistance mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 51, n.2, p. 133 -138, 2003.

CHELOSSI, E.; FAIMALI, M. Comparative assessment of antimicrobial efficacy of new potential biocides for treatment of cooling and ballast waters. **Science of the total environment**, Amsterdam, v. 356, n. 1-3, p. 1 -10, 2006.

CHESNEAU, H.L. The silent fuel killers (Stability and Microbiologicals). In. INTERNATIONAL JOINT POWER GENERATION CONFERENCE. **Proceedings...** Miami Beach. 2000.

CHUNG, Y.C. *et al.* Temperature and water effects on the biodeterioration for marine fuel oil. **Fuel**, Nottingham, v.79, n.12, p. 1525 -1532, 2000.

CID, E.A.; GOMES, H. O.; OLIVEIRA, L.V. Estabilidade físico-química de óleo-diesel. In: SEMINÁRIO SOBRE QUALIDADE E USO DE COMBUSTÍVEIS PARA VEÍCULOS PESADOS,1994. **Trabalhos técnicos...**, Rio de Janeiro, IBP, p. 154 -159.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.51, n.4, 277-282, 2003.

COOPER, G.M. **The Cell A Molecular Approach**, 2.ed., A.S.M. Press, Washington, 2000, 713p.

CRUZ, G. G. *et al.* Degradação de óleo diesel por *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 e teste de fitotoxicidade. In: ENAMA (Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental), 6., 2008, Fortaleza – Ceará. **Resumos...** Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2008. 1CD.

CURY, A.E. *et al.* Testes de sensibilidade in vitro a antifúngicos 2006. **Microbiologia in foco**, São Paulo, v.1, p.24-34, 2007.

DAVIS, J.B. **Petroleum microbiology**. Amsterdam, Elsevier. 604p, 1967.

DEMELLO, J.A *et al.* Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 54, n. 7, p. 894–904, 2007.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.1, p.47-64, 1997.

DIEHL, M., A.; CHAPMAN, J. Association of the biocide 5-chloro-2-methyl-isothiazol-3-one with *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v.44, n.4, p. 191–199, 1999.

DO VALLE, S.M.; VIDELA, H. Biocorrosão do alumínio 2024 e biodeterioração do combustível por contaminantes fúngicos. In. LABBS LATINO AMERICANO BIODETERIORATION SYMPOSIUM, 1., Campos do Jordão, **Anais...** São Paulo: TecArt Editora, 1992.p. 192-199.

DOMINGOS, A. K. *et al.* The influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (Biodiesel). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.18, n.2, p.416-423, 2007.

DORRIS, M.M.; PITCHER, D. Effective treatment of microbially contaminated fuel storage tanks. In: DISTILLATE FUEL: CONTAMINATION, STORAGE AND HANDLING, ASTM STP 1005, H.L. Chesneau and M.M.Dorris. **Trabalhos técnicos....** Philadelphia: American Society For Testing and Materials, 1988. p.146-156.

DUNN, R.O. Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel). **Fuel Processing Technology**, Pennsylvania, v.86, n.10, p.1071–1085, 2005.

FAIRBANKS, M. Biocidas. **Química e Derivados**, São Paulo Ed. 473, 2008.
Disponível em:
<<http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd473/biocidas/biocidas01.html>>
Acessado em : 04 de fev. 2009.

FAIRBANKS, M. Garantia de Qualidade anima vendas. **Química e Derivados**, São Paulo. Ed. 395, 2001. Disponível em:
<<http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd395/biocidas1.html>>
Acessado em 04 de mar. 2009.

FERRARI, R.A.; SOUZA, W.L. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.1, p. 106-111, 2009.

FONTES, G. C., AMARAL P. F.F., COELHO, M. A.Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, Campinas, v. 31 n. 8, p.2091-2099, 2008.

FRITSCH, W.; HOFRICHTER, M. Aerobic Degradation by Microorganisms. **Biotechnology Techniques**, Northwood, v. 11, p. 145-167, 2000.

GAYLARDE, C.,C. Desing, selection and use of biocides. In: _____ **Bioextraction and Biodeterioration of metals**. The biology of world resources series. Cambridge:Cambridge University Press, 1995, cap. 10, p. 327-361.

GAYLARDE, C.C.; BENTO, F.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 30, n.1, p. 1-10, 1999.

GERPEN, J. H. V. *et al.* Determining the influence of contaminants on biodiesel properties . **SP - Society of Automotive Engineers**, New York, n.1274, p.173-190, 1997.

GERPEN, J. V. *et al.* **Biodiesel Analytical Methods**. National Renewable Energy Laboratory. Cole Boulevard, Golden, Colorado. Jul. 2004. 96pg.

GONÇALVES, N.J.; SÉRVULO, E.F.C.; FRANÇA, F.P. Ação de biocida à base de glutaraldeído e sal quaternário de amônio no controle de microrganismos sésses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CORROSÃO, 22., 2002. CONFERÊNCIA SOBRE TECNOLOGIA DE EQUIPAMENTOS,6., Salvador. **Anais...**São Paulo: Monterrer Produções Gráficas e Digitais, 2002. v. 1. p. 1-12

GUTHEIL, N. G. Ocorrência de *Cladosporium resinae* (Lindau) de Uries em Querosene de aviação no Brasil. Porto Alegre, Instituto Tecnológico do RS. 4p. (Boletim n.9), 1966.

HAINES, J. R. *et al.* Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populations by a 96-well plate most-probable-number procedure. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 16, n.1, p. 36-41, 1996.

HENDEY, N.I. Some observations on *Cladosporium resinae* as fuel contaminant and its possible role in the corrosion of aluminum alloy fuel tanks. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.47, p. 467 - 475, 1964.

ILORI, M.O., ADEBUSOYE, S. A., OJO, A.C. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing yeast strains obtained from a polluted lagoon water. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 2539-2545, 2008.

JACOBSON, A; WILLIAMS, T.M. The environmental fate of isothiazolone biocides. **Chimica oggi**, Milano, v.18, n.10, p. 105 -108, 2000.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, Pennsylvania, v. 88, n. 7, p.669–677, 2007.

KOUKER, G.; JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.1, p.211-213, 1987.

LALMAN, J.A.; BAGLEY, D.M. Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. **Water Research**, Oxford, v.35, n.12, p.2975-2983, 2001.

LEITE, R.C.S. *et al.* Processos de Oxidação em Sistemas Aquáticos de Diesel Aditivado ou Misturado com Biodiesel do Óleo de Soja. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Artigos técnico-científico...** Brasília: Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamentoll.htm> Acesso em: 22 jul. 2008.

LEMONS, J.L.S. ; PEREIRA, L.T.C. Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus niger* e *Penicillium coryphilum*. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 7., 2004, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos...** Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral, 2004. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XII_jic_2004/> Acessado em: 15 out. 2008.

LEUNG, D.Y.C.; KOO, B.C.P.; GUO, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. **Bioresource Technology**, Barking, v. 97, n.2, p. 250-256, 2006.

LIANG, Y.C. *et al.* The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. **Fuel**, Nottingham, v.85, n.5-6, p.867-870, 2006.

LUIS, Y.M. *et al.* Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.32, n.1, p.69-75; 2000.

MACEDO, G.A.; MACEDO, J.A. Biodiesel- Produção de biodiesel por transesterificação de óleo vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 42, pg. 48-46. 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/>>. Acesso em: 12 set. 2006.

MARCHETTI J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Colorado, v.11, n.6, p.1300 - 1311, 2007.

MARIANO, P., ANGELIS, D.F., BONOTO, D.M. Monitoring of geochemical indicators and biodegradation evaluation at a site contaminated with diesel oil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v.12, n.3, p.269-304, 2007.

MEHDI, H., GITI, E. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.62, n.2, p. 170-178, 2008.

MILLER, N. J.; MUDGE, S. M. The effect of biodiesel on the rate of removal and weathering characteristics of crude oil within artificial sand columns. **Spill Science & Technology Bulletin**, New York, v. 4, n.1, p. 17–33, 1997.

MILLER, R. M., ZHANG, Y. Chapter 4 Measurement of biosurfactant-enhanced solubilization and biodegradation of hydrocarbons. **Bioremediation Protocols: Humana Press: Nova Jersey**, p.59-66, 1997.

MIRANDA, R.C. *et al.* Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco –Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasil, v. 50, n. 1, p.147 - 152, 2007.

MORAGAS, W.M.; SCHNEIDER, M.O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 3, n.10, p.26-40, 2003.

MUDGE, S.M., PEREIRA, G. Stimulating the biodegradation of crude oil with biodiesel preliminary results. **Spill Science & Technology Bulletin**, New York, v. 5, n.5-6, p. 353–355, 1999.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, Amherst, v. 133, n.2, p.183–198, 2005.

MURUGESAN, A; *et al.* Bio-diesel as an alternative fuel for diesel engines—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Colorado, v.13, n. 3, p. 653-662, 2009, a.

MURUGESAN, A; *et al.* Production and analysis of bio-diesel from non-edible oils—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Colorado, v.13, n. 4, p. 825–834, 2009, b.

NEIHOF, R.; MAY, M. Microbial and particulate contamination in fuel tanks on naval ships. **International Biodeterioration Bulletin**, London, v.19, n.2, p. 59-68, 1983.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, Campinas, v. 25, n. 5, p.772-776, 2002.

OLSON, J. J. *et al.* Biodegradation rates of separated diesel components. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v.18, n11, p. 2448-2453, 1999.

OWSIANIAK, M. *et al.* Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, Barking, v.100, n 3, p.1497 -1500, 2009.

PARBEY, D.G. **The kerosene fungus, *Amorphoteca resiniae*; its biology, taxonomy and control.** (Tese de doutorado), Universidade de Melbourne, Australia, 215p, 1970.

PARIA, S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v.138, n.1, p.24-58, 2008.

PASQUALINO, J.C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass & Bioenergy**, Aberdeen, v. 30, p. 874–879, 2006.

PASSMAN, F. J. ASTM International. **Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control**, Manual 47. West Conshohocken, 2003,114 p.

PASSMANN, F. New guides for diagnosing and controlling microbial contamination in fuel and fuel systems. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY, HANDLING AND USE OF LIQUID FUELS, 7., 2000. Espanha. **Proceedings**...Setembro, p.24-29, 2000.

PASSMANN, F.; DOBRANICK, J.K. Relative biodegradability of B¹⁰⁰ biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY, HANDLING AND USE OF LIQUID FUELS, 9., 2005. **Proceedings**... Espanha, Setembro, p.18-22, 2005.

PASSMANN, F.J.; MC FARLAND, B.L.; HILLYER, M.J. Oxygenated gasoline biodeterioration and its control in laboratory microcosms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.47, n.7, p. 95-106, 2001.

PRINCE, A.E. Microbial sludge in jet aircraft fuel. **Developments in Industrial Microbiology**, New York, v.2, p.197-203, 1961.

PRINCE, R.C.; HAITMANEK, C.; LEE, C.C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere**, Oxford, v. 71, n.8, p. 1446–1451, 2008.

RAMOS, J. M. *et al.* Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology** , Barking, v.100 , n. 1, p.261–268, 2009

REDDY,R.S. Fuel Filter Plugging by Insoluble Sediment in Diesel Fuels. In: DISTILLATE FUEL: CONTAMINATION, STORAGE AND HANDLING, ASTM STP 1005, H.L. CHESNEAU AND M.M.DORRIS. Eds. American Society For Testing and Materials, Philadelphia, p. 82-84,1998.

- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.44, n.2-3, p.93-100, 1999.
- ROGERS, M.R.; KAPLAN, M.A. Role of Microbial and Nonmicrobial Contaminants in Diesel-fueled Vehicle Malfunctions. **Development in Industrial Microbiology**. v. 24, p.147-165, 1982.
- RUSSEL, A.D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v.3, n.12, p.794-803, 2003.
- SANTOS, C.M.C., MACHADO, C.R., GONZÁLES, W.A. Causa do Aumento da Acidez do Óleo Bruto durante o Armazenamento. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Artigos técnico-científico...** Brasília: Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007. Disponível em: <
http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamentoll.htm> Acesso em: 22 jul. 2008.
- SCHLEICHER, T. *et al.* Microbiological stability of biodiesel - diesel mixtures. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, n.2, p.724-730, 2009.
- SCHWARTZ, R.D.; LEATHEN, W.W. Petroleum Microbiology. **Industrial Microbiology**, New York, Graw-Hill. p. 384-411, 1976.
- SCOOT, P.J.B. Microbiologically influenced corrosion monitoring: realworld failures and how to avoid them. **Materials Performance**, Houston, v.39, n.11, p.54-59, 2000.
- SHARMA, S.L.; PANT, A. Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine *Rhodococcus sp.* **Biodegradation**, Dordrecht, v.11, n.5, p. 289–294, 2000.
- SHARMA, Y.C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. **Fuel**, Nottingham, v.87, n.12, p.2355-2373, 2008.
- SILVA, M. L. B., ALVARES, P. J. J. Effects of ethanol versus MTBE on benzene, toluene, ethylbenzene and xylene natural attenuation in aquifer columns. **Journal of Environmental Engineering**, Reston, v.128, n.9, p.862-

865, 2002.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.25, n. 1, p.99-121, 2007.

SINGH, H. Fungal Metabolism of Petroleum Hydrocarbons. In: _____.. **Mycoremediation: Fungal Bioremediation**. John Wiley Professio, 2006. cap. 4, p.115-148.

SMITH,R.N. Developments in fuel microbiology. In:INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION SYMPOSIUM, 8., 1991, London. **Proceedings...** London: Elsevier, p. 112 -124, 1991.

SOUZA, A. G. *et al.* A thermoanalytic and kinetic study of sunflower oil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 21, n. 2, April – June, 2004.

SOUZA, C. S. *et al.* Isolamento e Seleção de Microrganismos Degradadores de Derivados de Petróleo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PETRÓLEO E GÁS, 3., 2005, Salvador. **Anais...** Salvador: IBP. 2005. Disponível em <http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0444_05.pdf >Acesso em: 22out. 2007.

THANOMSU, B. *et al.* Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n.3, p. 588–592, 2004.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 24, n.6, p. 604-620, 2006.

VIDELA, H. **Corrosão microbiológica**. Edgard Blücher. Biotecnologia Editora São Paulo, v.4, 65p., 1981.

VIEIRA, J. A. V.; PORTILHO, B. D.;LIMA, M. S. Remoção e Reabsorção de Água em Biodiesel de Mamona & Soja. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Artigos técnico-científico...** Brasília: Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamentoll.htm> Acesso em: 22 jul. 2008.

VIEIRA, T. M. *et al.* Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1., 2006, Brasília. **Artigos técnico-científico...** Brasília: Estação Gráfica, v.1. p. 218-22, 2006. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamento.html> Acesso em: 22 jul. 2008.

VIEIRA, T. M. *et al.* Utilização de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) em Teste Rápido de Caracterização de Potenciais Biodegradadores de Biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Artigos técnico-científico...** Brasília: Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamentoll.htm> Acesso em: 22 jul. 2008.

WATKINSON, R. J.; MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Biodegradation**, Dordrecht, v.1, p. 79-92, 1990.

WESTBROOK, S. R.; *et al.* Methodology for Identification of Diesel Fuel System Contaminants Related to Problems in the Field. In: Distillate Fuel: Contamination, Storage and Handling, ASTM STP 1005, H.L. Chesneau and M.M.Dorris. **Proceedings...** Eds. American Society For Testing and Materials, Philadelphia, p.47-47, 1988.

WHITE, D. G.; McDERMOTT, P. F. Biocides, drug resistance and microbial evolution. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.4, n 1, p.313-317, 2001.

WILLIAMS, T.M.; HAACK, T.K.; ROBBINS, J.A. Biocide Treatment for control of microbial contamination and fuel quality problems. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY AND HANDLING OF LIQUID FUELS, 4., 1991, Florida. **Proceedings...** Florida, v.16, p 1991.

WILSON, D. N.; NIERHAUS, K.H. The Oxazolidinone Class of Drugs Find Their Orientation on the Ribosome. **Molecular Cell**, Cambridge, v.26, n.4, p. 460-462, 2007.

XIN, J.; IMAHARA, H.; SAKA, S. Kinetics on the oxidation of biodiesel stabilized with antioxidant. **Fuel**, Nottingham, v.88, n.2, p.282-286, 2009.

YEMANSHOVA, A. N. *et al.* Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Dordrecht, v. 6, n.4, p 315-337, 2007.

ZAPORALI, D. Substâncias agressivas prejudicam inovações **Química e Derivados**. São Paulo Ed. 441, 2005. Disponível em:
<<http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd441/biocidas1.html>> Acessado em 10 de mar.2006.

ZHANG, Q. *et al.* Efficient and eco-friendly process for the synthesis of N-substituted 4-methylene-2-oxazolidinones in ionic liquids. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.46, n.35, p. 5907–5911, 2005.

ZHANG, X. *et al.* Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of American Society of Agricultural Engineers**, St. Joseph, v. 41, p. 1423–1430, 1998.

ZIMMER, T.P. *et al.* A cold active (2R,3R)-(-)-di-O-benzoyl-tartrate hydrolyzing esterase from *Rhodotorula mucilaginosa*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.73, n. , p. 132–140, 2006.

9. Anexos

9.1 Meios de cultura utilizados

9.1.1 Meio Mínimo Mineral

Macronutrientes

KCl	0,7 g/L		
KH ₂ PO ₄	2,0 g/L	ou K ₂ HPO ₄	1,55 g/L
Na ₂ HPO ₄	3,0g/L	ou NaH ₂ PO ₄	2,9 g/L
NH ₄ NO ₃	1,0 g/L		

Micronutrientes

MgSO ₄	4,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	8,2 g/L
FeSO ₄	2,0 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,36 g/L
MnCl ₂	0,2 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,31 g/L
CaCl ₂	0,2 g/L

pH 7,2

9.1.2 Ágar malte

Extrato de malte	30g/L
Peptona	5 g/L
Ágar	15 g/L
pH 5,4	

9.1.3 Caldo malte

Extrato de malte	30g/L
Peptona	5 g/L
pH 5,4	

9.1.4 Caldo GYMP

Extrato de malte	20g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Fosfato de sódio monobásico	2 g/L
Glicose	20g/L

9.2 Peso seco

Curvas de crescimento com os fungos filamentosos

Cálculo para a obtenção do crescimento fúngico através do acompanhamento de peso seco em função do tempo de imersão nos sistema fase aquosa/óleo diesel.

Peso inicial - Peso final = Variação de massa (g)

A técnica utilizada de peso seco para o monitoramento do crescimento fúngico em sistemas com óleo diesel, exige alguns cuidados que são brevemente apresentados. É importante a observação dos passos utilizados na obtenção do valor final da biomassa quantificada, pois alguns fatores podem interferir, tais como:

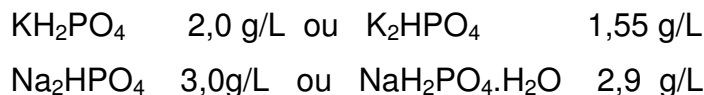
* incorporação de frações de diesel á “biomassa quantificada” decorrente da composição do combustível, podendo ficar retida e causar desvios na determinação, uma vez que não são volatilizadas a 70°C (temperatura de secagem que foi colocado, os filtros com a biomassa). Por esta razão, após a filtragem, a biomassa foi lavada com 15 mL de hexano.

* dificuldade de homogeneização, decorrente da existência, nas diversas etapas de cultivo de fração de hidrocarbonetos não degradada, degradada parcialmente (formação de emulsão na interface), e da presença de longas hifas na fase oleosa e de conidiosporos na fase aquosa.

9.3 Efeito tampão das soluções contendo fosfato:

As soluções tampões apresentam a propriedade de resistir a uma modificação de pH, por efeito de uma diluição ou adição de pequenas quantidades de ácido ou base fortes. As soluções mais usadas são as constituídas da mistura de ácidos fracos e seus sais ou de bases fracas e seus sais.

A capacidade tamponante de um par tampão depende não somente da relação das concentrações de seus componentes, mas também das concentrações efetivas destes componentes. No presente caso temos:



Em termos mais qualitativos, a capacidade tamponante é definida como sendo o número de moles de base forte requerida para ocasionar o incremento de uma unidade de pH em 1 litro de solução tampão. Na prática utiliza-se soluções tampões com os componentes em concentrações de 0,05 a 0,2 M.

9.4 Degradação de ésteres de ácidos graxos

Cálculo para a obtenção da percentagem de degradação do biodiesel (B100), submetido aos ensaios de imersão com os microrganismos testados, com a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa.

Os dados obtidos como tempo de retenção, área de cada pico e percentual da área de cada pico foram calculadas através de um programa específico de um computador (em interface com o cromatógrafo), que utiliza métodos padrões utilizados na cromatografia gasosa para o cálculo das áreas dos picos (integração das áreas).

O percentual de degradação de cada pico C16; C18; C18:1;C18:2; C18:3; para cada microrganismo testado, foi calculado com base nos dados fornecidos pelo programa de computador, em termos de % de área de cada pico apresentado pelo controle. O controle corresponde ao biodiesel (B100) submetido as mesmas condições de incubação que os demais tratamentos, mas sem contato com microrganismo.

Exemplo: % de degradação do pico C₁₁ aos 60 dias

* % da área do pico do C16 para o controle: 884826,50

* % da área do pico do C16 para o *Aspergillus fumigatus*: 749671,73

Temos: 884826,50--⁻¹00%

749671,73-----x

$$x = 84,72\%$$

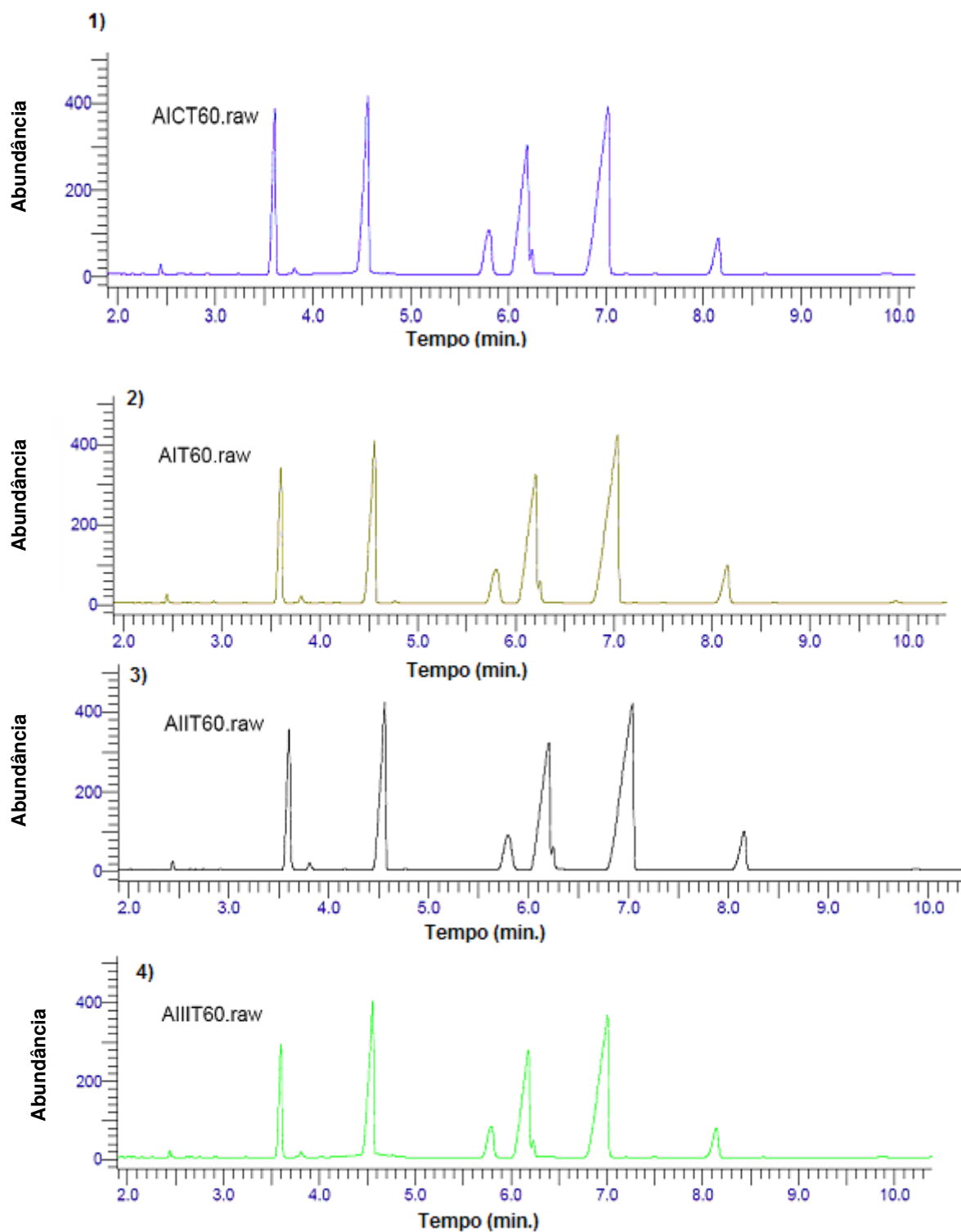
* Para saber o percentual de degradação do pico C_x:

$$100-84,72= 15,27 \%$$

Considerações sobre o Ensaio Controle: A importância de se realizar a análise cromatográfica, com o hidrocarboneto que foi submetido as mesmas condições da incubação com os microrganismos, reside no fato da possibilidade de perdas decorrentes de evaporações, de cadeias carbônicas durante o período de incubação (Do Valle, 1991) ou até mesmo pela adsorção nas paredes dos frascos (Olson *et al.*, 1999). A autoxidação e a fotoxidação pode mudar a natureza do hidrocarboneto, embora a magnitude estimada de perda devido a esses processos varia mais rápido que a biodegradação (Oslon *et al.*, 1999). Caso contrário, poderão ocorrer interpretações falsas a cerca do potencial de degradação das espécies microbianas em estudo.

9.5. Cromatogramas

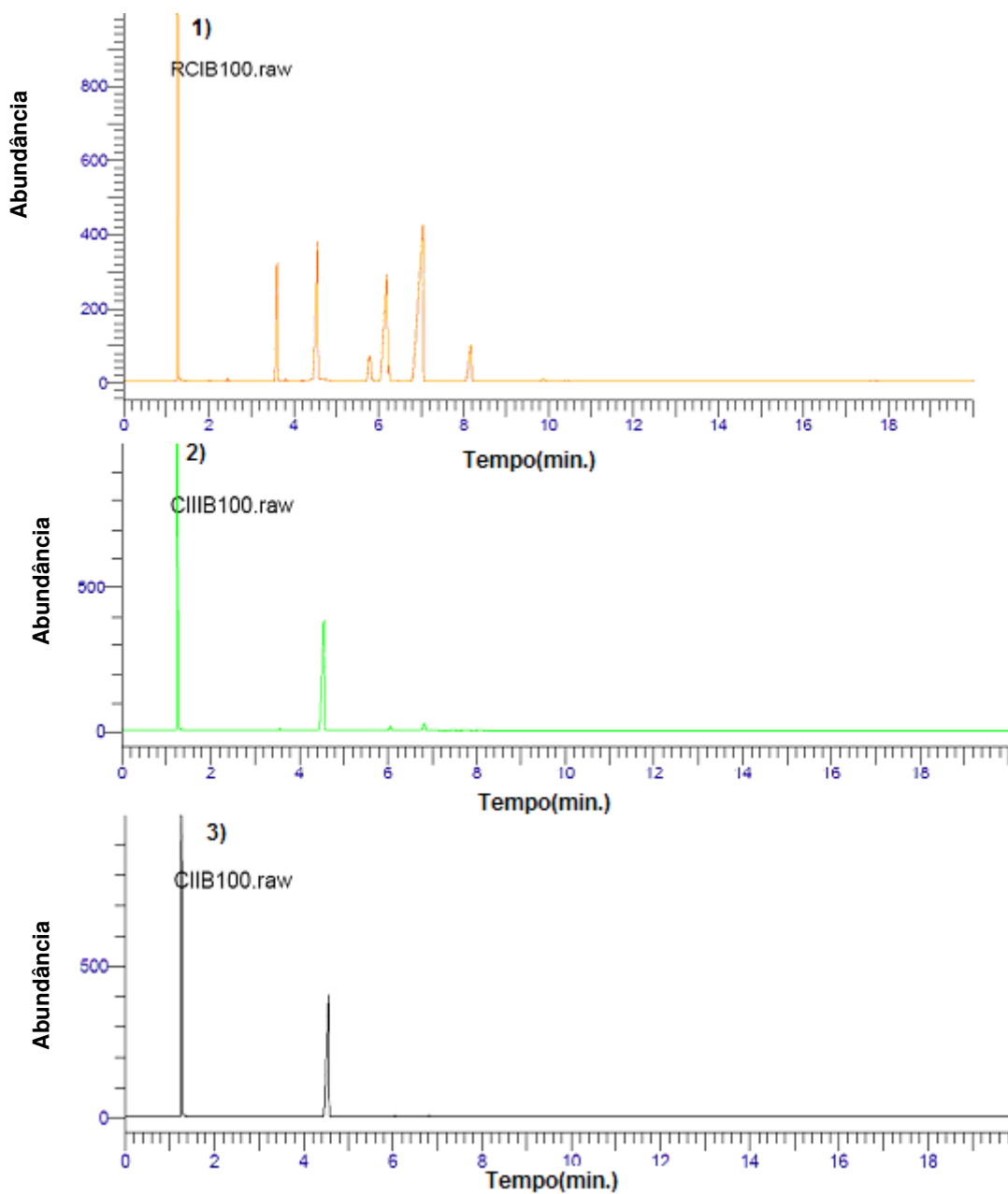
9.5.1 Cromatogramas obtidos para a avaliação da degradação por *Aspergillus fumigatus*



Cromatogramas mostrando a degradação de biodiesel (B100) após 60 dias de avaliação. 1) Tratamento Controle (sem inóculo). 2, 3, 4) Tratamentos com incubação de *Aspergillus fumigatus*.

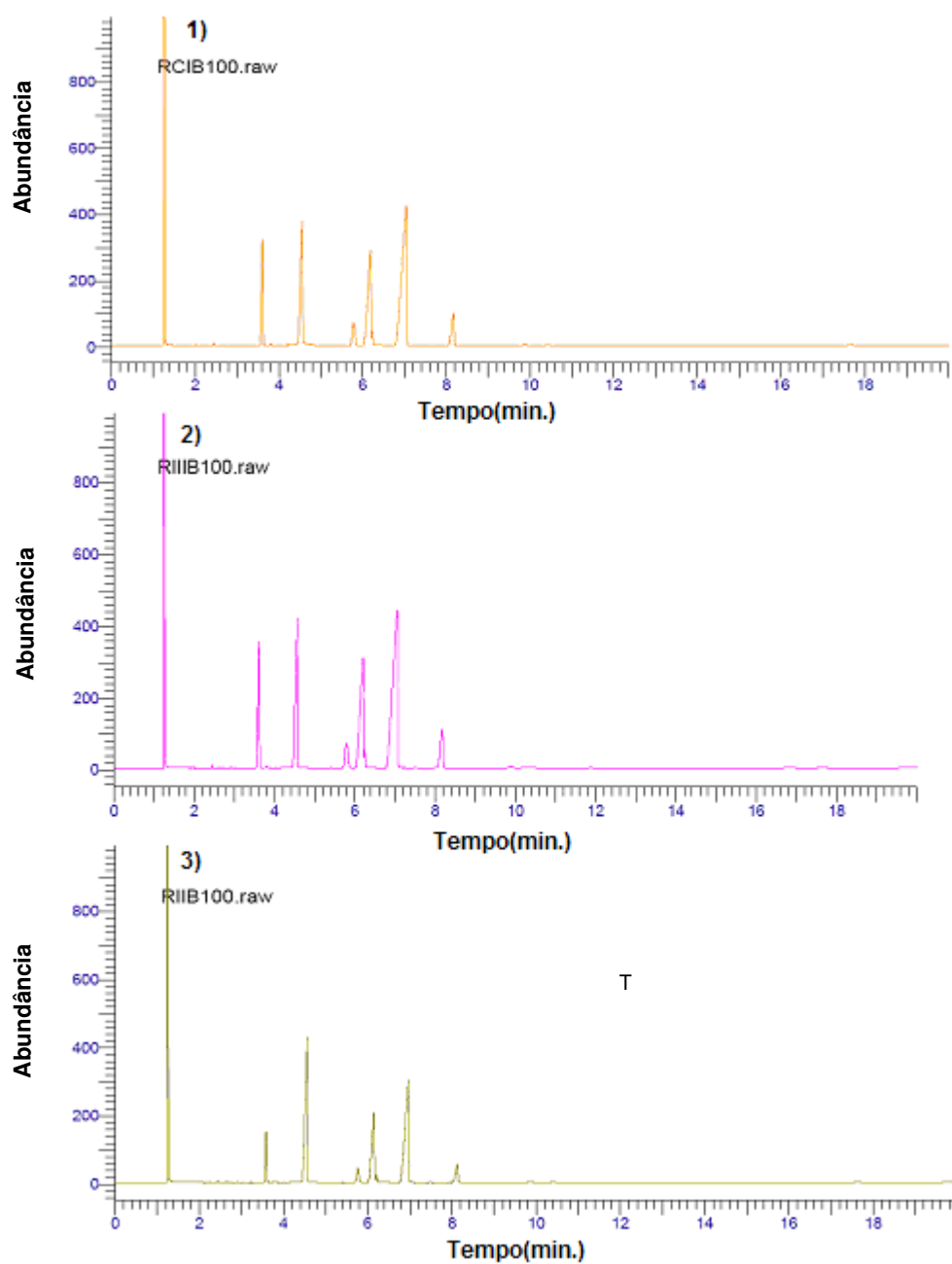
9.5.2 Cromatogramas obtidos para a avaliação da degradação por

Candida silvicola



Cromatogramas mostrando a degradação de biodiesel (B100) após 7 dias de avaliação. 1) Tratamento Controle (sem inóculo). 2 e 3) Tratamentos com incubação de *Candida silvicola*.

9.5.3 Cromatogramas obtidos para a avaliação da degradação por *Rhodotorula sp.*



Cromatogramas mostrando a degradação de biodiesel (B100) após 7 dias de avaliação. 1) Tratamento Controle (sem inóculo). 2 e 3) Tratamentos com incubação de *Rhodotorula spp.*

10. Vitta

10.1 Dados pessoais

Nome: Francielle Bücke

Filiação: Marli Kucner Bücke e Wilmuth Bücke

E-mail: franbucker@gmail.com

10.2 Formação Acadêmica Titulação

- 2007-2009 - Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Universidade federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.
- 2002-2006 - Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura
Universidade federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.
- 1999-2001 - Ensino Médio
Colégio Evangélico Martin Luther, Estrela, RS, Brasil.
- 1991-1998 - Ensino Fundamental
Escola Estadual de Ensino Médio e Fundamental 25 de Maio,
Imigrante, RS, Brasil.

10.3 Experiência Profissional

- 2006 Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Estágio em estudo sobre Suscetibilidade à contaminação
microbiana das misturas B2 e B5 durante a estocagem.
- 2005- 2006 Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Iniciação Científica em Ecologia de Riachos em estudo
sobre Microdistribuição de duas espécies de Aegla
(Aeglidae: Crustacea) num riacho de Igrejinha.
- 2004 Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Estágio em estudo sobre Isolamento e Identificação de
actinomicetos isolados de processo de compostagem.