



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

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM  
BODIESEL DE LINHAÇA, SOJA E OLIVA**

JUCIANA CLARICE CAZAROLLI  
Bacharel em Ciências Biológicas

Porto Alegre,  
Março de 2013



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

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM  
BIODIESEL DE LINHAÇA, SOJA E OLIVA**

**JUCIANA CLARICE CAZAROLLI**  
Bacharel em Ciências Biológicas

Dissertação de Mestrado, apresentada como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fátima Menezes Bento

Porto Alegre,  
Março de 2013

À minha família, que mesmo de longe se fazem presentes, me incentivando a perseguir meus sonhos e a ser verdadeiramente feliz.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora, Fátima Menezes Bento, por todo o apoio, amizade e interesse dedicados a mim durante a realização deste trabalho.

Aos Professores Dimitrios Samios, Maria do Carmo Ruaro Peralba e Rosane Rech por todos os ensinamentos e disponibilidade em atender-me sempre que possível.

Ao amigo Rafael Guzatto pela disponibilidade de ajudar, ouvir e sempre estar pronto para desfazer minhas dúvidas.

Aos colegas dos Laboratórios 167 e Laboratório de Microbiologia do Departamento de Solos pela companhia, auxílio e amizade e por todo o suporte que me foi dado, facilitando o trabalho sempre que possível e criticando sempre que necessário.

Aos colegas do laboratório D110 do Instituto de Química, pela parceria, paciência e amizade, tão importantes nesses momentos.

Ao CNPq e à CAPES pelo investimento.

Aos meus Pais pelo incentivo constante, pelas lições de vida, pelo suporte emocional e carinho incondicional. À minha irmã Luisa e meu cunhado Rafael, por estarem presentes sempre, mesmo de longe.

À Eduardo Verruck Acker, pelo amor irrestrito, carinho, apoio, compreensão e paciência que teve comigo nesse período de mestrado.

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

# **AVALIAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM BIODIESEL DE LINHAÇA, SOJA E OLIVA<sup>1</sup>**

## **RESUMO**

A matéria prima do biodiesel pode conferir ao biocombustível uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento microbiano no armazenamento. Neste sentido, avaliou-se o papel deteriogênico de três fungos filamentosos em meio aquoso com biodiesel produzido a partir de óleo de oliva, soja e linhaça, durante 120 dias. O experimento foi montado em frascos de vidro, com 30 mL de meio mineral e 15 mL de cada biodiesel, e adicionado inóculo dos fungos. O experimento foi conduzido em triplicata e as análises foram realizadas aos dias 0, 7, 14, 21, 28, 42, 60 e 120. A cada tempo amostral avaliou-se: formação de biomassa; consumo de fosfatos; produção de metabólitos e de lipase. Para determinar a concentração mínima fungistática e fungicida foram avaliados quatro antimicrobianos (MBO8%, MBO50%, MBO100% e NBM100%). Os fungos cresceram em todos os biodieseis testados, sendo que as medidas de tensão superficial não indicaram produção de biossurfactantes, e as de pH demonstraram a produção de metabólitos ácidos aos 120 dias. Aos 7 dias de incubação foi detectada a produção máxima de lipase e a presença dos ésteres palmitato (C16), estearato (C18), oleato (C18:1), linoleato (C18:2) e linolenato de metila (C18:3) na fase aquosa. Não foi observada degradação dos ésteres dos biodieseis pelos fungos. Os aditivos MBO (8 e 50%) não apresentaram atividade fungistática e fungicida nas concentrações testadas, no entanto, para o antimicrobiano NBM100% a concentração de 250ppm foi fungicida para os fungos testados.

<sup>1</sup>Dissertação 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 (155p.), março, 2013.

## **EVALUATION OF FILAMENTOUS FUNGI IN BIODIESEL FROM LINSEED, SOY AND OLIVE<sup>2</sup>**

### **ABSTRACT**

The raw material for biodiesel can increase its susceptibility to microbial growth in storage. In this sense, we evaluated the deterioration role of three filamentous fungi in aqueous medium with biodiesel produced from olive oil, soybean and linseed oil for 120 days. The experiment was performed in glass vials with 30 ml mineral medium and 15 mL of each biodiesel, and the inoculum of the fungi added. The experiment was conducted in triplicate, and analyzes were performed on days 0, 7, 14, 21, 28, 42, 60 and 120. At each sampling time were evaluated: biomass formation, consumption of phosphates, production of metabolites and lipase. To determine the minimal fungistatic and fungicidal concentration was evaluated four antimicrobials (MBO8% MBO50% MBO100% and NBM100%). The fungi grew in all tested biodiesels, and the surface tension measurements indicated no biosurfactant production, the pH values demonstrated the production of acidic metabolites in 120 days. After 7 days of incubation, the maximum production of lipase was detected and the presence of the esters methyl palmitate (C16), stearate (C18), oleate (C18: 1), linoleate (C18: 2) and linolenate (C18: 3) were detected in aqueous phase. There was no degradation of esters of biodiesels by fungi. The additives MBO (8 and 50%) showed fungistatic and fungicidal activity at the concentrations tested, however, for the antimicrobial NBM100% the concentration 250ppm was fungicidal for all the fungi tested.

<sup>2</sup>Master 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. (155 p.) Março, 2013.

## ÍNDICE

<b>1. Introdução</b> .....	16
<b>10. Apêndice II</b> .....	153
<b>11. Anexo I</b> .....	154
<b>11.1 Formulações dos Meios Mínimos</b> .....	154
<b>12. Curriculum Vitae</b> .....	155
<b>2. Objetivo Principal</b> .....	19
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	19
<b>3. Biodiesel: Produção e Propriedades</b> .....	20
<b>3.1 Importância dos Biocombustíveis</b> .....	20
<b>3.2 Produção de Biodiesel</b> .....	21
<b>3.3 Matérias primas</b> .....	25
<b>3.4 Degradação Biótica</b> .....	32
<b>3.4.1 Principais Micro-organismos Deteriogênicos</b> .....	33
<b>3.5 Condições para o Crescimento Microbiano</b> .....	35
<b>3.5.1 Água</b> .....	35
<b>3.5.2 Competência Enzimática</b> .....	36
<b>3.6 Degradação Microbiana de Combustíveis</b> .....	38
<b>3.6.1 Biodegradação de Biodiesel (óleos vegetais)</b> .....	42
<b>3.7 Fungos Degradores de Combustíveis</b> .....	45
<b>3.7.1 Crescimento e fisiologia</b> .....	45
<b>3.7.2 Exoenzimas fúngicas</b> .....	47
<b>3.7.3 Necessidades energéticas</b> .....	51
<b>3.8 Contaminação Microbiana em Combustíveis</b> .....	52
<b>3.8.1 Medidas de Controle do Crescimento Microbiano</b> .....	54
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	60
<b>4.1 Biodieseis</b> .....	60
<b>4.1.1 Produção</b> .....	60
<b>4.1.2 Esterilização</b> .....	61
<b>4.2 Meio Mínimo Mineral</b> .....	61
<b>4.3 Micro-organismos</b> .....	62
<b>4.4 Preparação do Inóculo</b> .....	64

<b>4.5 Fase Preliminar</b> .....	64
<b>4.5.1 Seleção de Fase Aquosa</b> .....	65
<b>4.5.2 Seleção do volume da Fase Oleosa</b> .....	65
<b>4.5.3 Interações Fase Oleosa x Fase Aquosa</b> .....	67
<b>4.5.3.1 Concentração de Fosfato</b> .....	67
<b>4.5.3.2 Medidas de pH</b> .....	68
<b>4.5.3.3 Cromatografia Gasosa com Detector de Massas (CGMS)</b> .....	68
<b>4.6 Fase de avaliação</b> .....	69
<b>4.6.1 Curva de crescimento dos fungos filamentosos em biodiesel de linhça, soja e oliva</b> .....	69
<b>4.6.2 Análises Conduzidas</b> .....	70
<b>4.6.2.1 Interface Água/Óleo – Quantificação da biomassa</b> .....	71
<b>4.6.2.2 Fase aquosa</b> .....	72
<b>4.6.2.2.1 Determinação da Concentração de fosfato na fase aquosa</b> .....	72
<b>4.6.2.2.2 Medida de Tensão superficial</b> .....	72
<b>4.6.2.2.3 Detecção da produção de metabólitos ácidos</b> .....	73
<b>4.6.2.2.4 Detecção da produção de Lipase</b> .....	73
<b>4.6.2.3 Fase oleosa</b> .....	74
<b>4.6.2.3.1 Cromatografia Gasosa</b> .....	74
<b>4.7 Controle do Crescimento Fúngico utilizando Antimicrobianos</b> .....	75
<b>4.7.1 Antimicrobianos</b> .....	75
<b>4.7.2 Concentração Inibitória Mínima (CMI) e Concentração Mínima Biocida (CMB)</b> .....	76
<b>4.8 Análise Estatística</b> .....	77
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	78
<b>5.1 Fase Preliminar</b> .....	78
<b>5.1.1 Seleção da Fase Aquosa (Meio Mínimo Mineral)</b> .....	78
<b>5.1.2 Valores de pH dos Meios Mínimos Minerais</b> .....	82
<b>5.1.3 Monitoramento da Concentração de Fosfatos nos Meios Mínimos Minerais</b> .....	84
<b>5.1.4 Seleção do volume da Fase Oleosa.</b> .....	88
<b>5.1.5 Interação Fase Oleosa x Fase Aquosa</b> .....	91

<b>5.2 Fase de Avaliação</b> .....	96
<b>5.2.1 Crescimento Fúngico nos biodiesel analisados</b> .....	96
<b>5.2.2 Concentração de Fosfato</b> .....	99
<b>5.2.3 Produção de Lipase</b> .....	103
<b>5.2.4 Valores de pH</b> .....	106
<b>5.2.5 Tensão Superficial da Fase Aquosa</b> .....	110
<b>5.2.6 Degradação dos Ésteres</b> .....	112
<b>5.3 Controle do Crescimento Microbiano</b> .....	116
<b>6 Conclusões</b> .....	126
<b>7. Perspectivas</b> .....	128
<b>8. Referências</b> .....	129
<b>9 Apêndice I</b> .....	151
<b>9.1 Ressonância Magnética Nuclear</b> .....	151
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	XV
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XI
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XIV
<b>RESUMO</b> .....	VI

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da Reação de Transesterificação Metílica. (Adaptado de Leung & Leung, 2010).....	22
Figura 2. Estrutura química dos principais ésteres de ácidos graxos presentes no Biodiesel (Baseado em Suarez <i>et al.</i> , 2007). ....	29
Figura 3. Representação de um tanque aéreo de combustível contaminado. Fonte: Bento <i>et al.</i> , 2006. ....	36
Figura 4. Hidrólise de ligação éster catalisada por lipases ou carboxilesterases (Baseada em Santos, 2009). ....	42
Figura 5. Microfotografia dos micélios e conidióforos dos fungos utilizados nesse trabalho. (A) <i>Pseudallescheria boydii</i> , (B) <i>Paecilomyces variotii</i> , (C) <i>Scedosporium aurantiacum</i> .0.....	63
Figura 6. Aspecto dos frascos com as diferentes porcentagens de fase oleosa avaliadas, representando os frascos controle, usados para o experimento.....	66
Figura 7. Curva de crescimento dos Fungos Filamentosos em Biodiesel de Soja (Valores referentes a cada tempo analisado). (A) <i>Pseudallescheria boydii</i> ; (B) <i>Scedosporium aurantiacum</i> ; (C) <i>Paecilomyces variotii</i> . (MM1 – Richard & Vogel, MM2 – Tanner, MM3 – Bushnell & Haas, MM4 – Kaufmann & Kearney). ....	79
Figura 8. Valores de pH da fase aquosa com diferentes composições minerais durante a curva de crescimento dos fungos com óleo de soja como fase oleosa. ....	83
Figura 9. Valores de fosfato (mg/mL) presentes nos meios minerais durante a curva de crescimento do fungo <i>P. boydii</i> com óleo de soja como fase oleosa. ....	85
Figura 10. Valores de fosfato (mg/mL) presentes nos meios minerais durante a curva de crescimento do fungo <i>S. aurantiacum</i> com óleo de soja como fase oleosa. ....	86
Figura 11. Valores de fosfato (mg/mL) presentes nos meios minerais durante a curva de crescimento do fungo <i>P. variotii</i> com óleo de soja como fase oleosa ....	86
Figura 12. Valores de fosfato (mg/mL) do tratamento controle presentes nos meios minerais durante a curva de crescimento com óleo de soja como fase oleosa. ....	87

Figura 13. Valores de biomassa (mg) do crescimento dos fungos <i>P. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> e <i>P. variotii</i> na interface Óleo/Água com diferentes proporções de óleo. ....	90
Figura 14. Variação na concentração de fosfato no Meio Mineral Bushnell & Haas e água ultrapura (MiliQ). ....	91
Figura 15. Valores de pH do Meio Bushnell Haas e de água ultrapura (MiliQ) durante 120 dias de incubação. ....	92
Figura 16. Perfil de ésteres de ácidos graxos presentes no meio mínimo mineral após sete dias de incubação, com biodiesel de linhaça, soja e oliva. .	94
Figura 17. Curvas de crescimento dos fungos filamentosos durante 120 dias em fase aquosa e oleosa composta por Biodiesel de Linhaça, Soja e Oliva. (a) <i>Pseudallescheria boydii</i> ; (b) <i>Scedosporium aurantiacum</i> ; (c) <i>Paecilomyces variotii</i> .....	97
Figura 18. Valores de Concentração de fosfato durante a curva de crescimento do Fungo <i>Pseudallescheria boydii</i> em Biodiesel de Linhaça, Soja e Oliva. ...	100
Figura 19. Valores de Concentração de fosfato durante a curva de crescimento do Fungo <i>Scedosporium aurantiacum</i> em Biodiesel de Linhaça, Soja e Oliva. ....	100
Figura 20. Valores de Concentração de fosfato durante a curva de crescimento do Fungo <i>Paecilomyces variotii</i> em Biodiesel de Linhaça, Soja e Oliva. ....	101
Figura 21. Valores de Concentração de fosfato no meio mineral (controle) durante a curva de crescimento em Biodiesel de Linhaça, Soja e Oliva.....	102
Figura 22. Atividade de lipase detectada do fungo filamentoso <i>P. boydii</i> durante 120 dias de incubação. ....	104
Figura 23. Atividade de lipase detectada do fungo filamentoso <i>S. aurantiacum</i> durante 120 dias de incubação. ....	105
Figura 24. Atividade de lipase detectada do fungo filamentoso <i>P. variotii</i> durante 120 dias de incubação. ....	106
Figura 25. Valores de pH do crescimento do fungo filamentoso <i>P. boydii</i> em biodiesel de linhaça, soja e oliva. ....	107
Figura 26. Valores de pH do crescimento do fungo filamentoso <i>S. aurantiacum</i> em biodiesel de linhaça, soja e oliva. ....	108

Figura 27. Valores de pH do crescimento do fungo filamentoso <i>P. variotii</i> em biodiesel de linhaça, soja e oliva.....	108
Figura 28. Valores de pH do tratamento controle durante o crescimento fúngico em biodiesel de linhaça, soja e oliva.....	109
Figura 29. Porcentagem de ésteres de ácidos graxos presentes nos biodieseis de linhaça, soja e oliva, durante a curva de crescimento do fungo <i>P. boydii</i> e com o tratamento controle. (C – controle).....	113
Figura 30. Porcentagem de ésteres de ácidos graxos presentes nos biodieseis de linhaça, soja e oliva, durante a curva de crescimento do fungo <i>S. aurantiacum</i> e com o tratamento controle. (C – controle) .....	113
Figura 31. Porcentagem de ésteres de ácidos graxos presentes nos biodieseis de linhaça, soja e oliva, durante a curva de crescimento do fungo <i>P. variotii</i> e com o tratamento controle. (C – controle).....	114
Figura 32. Valores de Biomassa nos frascos com diferentes concentrações dos antimicrobianos utilizadas para controlar o crescimento do fungo <i>Pseudallescheria boydii</i> por 15 dias de cultivo.....	119
Figura 33. Valores de Biomassa nos frascos com diferentes concentrações dos antimicrobianos utilizadas para controlar o crescimento do fungo <i>Scedosporium aurantiacum</i> por 15 dias de cultivo.....	120
Figura 34. Valores de Biomassa nos frascos com diferentes concentrações dos antimicrobianos utilizadas para controlar o crescimento do fungo <i>Paecilomyces variotii</i> por 15 dias de cultivo. ....	121

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem dos principais ácidos graxos presentes nas matérias primas Linhaça, Soja, Oliva, Amendoim e Sebo Bovino. Adaptado de: Lazzari e Chiantore (1999); Ferrari <i>et al.</i> (2005), Oliveira <i>et al.</i> 2008) e Krause (2008). .	26
Tabela 2. Principais problemas relatados e grupo de micro-organismos relacionados na contaminação microbiana de sistemas de armazenamento de combustíveis. Fonte: Gaylarde <i>et al.</i> , 1999.....	53
Tabela 3.Ésteres componentes dos biodieseis encontrados nos meios minerais após 7 dias de incubação em condições estáticas. + presença, - ausência. ...	93
Tabela 4. Valores das medidas de Tensão superficial dos tempos 0, 7, 28, 60 e 120 dias de incubação da curva de crescimento dos fungos filamentos com biodiesel de linhaça, soja e oliva. Valores iniciais do meio mínimo mineral: 55,4 mN.m <sup>-1</sup> . .....	111
Tabela 5. Resultados da CMI em função dos quatro diferentes antimicrobianos testados com os seguintes micro-organismos: <i>P. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> e <i>P. variotii</i> . (+) crescimento detectado. ....	117
Tabela 6. Resultados da CMB em função dos quatro diferentes antimicrobianos testados com os seguintes micro-organismos: <i>P. boydii</i> , <i>S. aurantiacum</i> e <i>P. variotii</i> . (+) crescimento detectado. ....	118

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANP Agência Nacional do Petróleo  
PNPB Programa Nacional de Produção de Biodiesel  
CECOM Centro de Combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes e Óleos  
ANVISA agência nacional de vigilância sanitária  
BRS bactérias reductoras de sulfato  
BDN bactérias denitrificantes  
CoA coenzima A  
p-NPP p-nitrofenilpalmitato  
DCM diclorometano  
g grama  
Kg quilograma  
UV ultravioleta  
atm atmosfera  
°C Grau Celsius  
min minuto  
ppm parte por milhão  
M molar  
T temperatura  
m<sup>3</sup> Metro Cúbico  
mg miligrama  
mL mililitro  
mm milímetro  
MM meio mínimo mineral  
mN.m<sup>-1</sup> miliNewton por metro  
μL microlitro  
μm micrometro  
GC Cromatografia Gasosa  
GCMS Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massas  
FID Flame ionization detector  
CMI Concentração Mínima Inibitória  
CMB Concentração Mínima Biocida  
MBO 3,3-methylenebis(5-methyloxazolidine)  
NBM 4-(2-nitrobutyl)morpholyne  
MIT 2-methyl-2H-isothiazol-3-one  
CMIT 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one

## **1. Introdução**

A busca por fontes energéticas renováveis tornou possível a utilização de oleaginosas e resíduos graxos de origem animal como matéria prima para a produção de biocombustíveis, como o biodiesel. Neste sentido, a demanda por fontes renováveis aumentou com a crise do petróleo e desde 2005, o biodiesel vem fazendo parte da matriz energética brasileira.

Com a aprovação da Lei 11.097/2005, pelo Congresso Nacional em 13 de janeiro de 2005, tornando-se obrigatória a adição de biodiesel ao diesel de petróleo no Brasil. Atualmente, essa proporção é de 5% de biodiesel adicionado ao diesel (B5).

O biodiesel é composto por ésteres de ácidos graxos, produzidos pela reação de um ácido graxo, de origem animal ou vegetal, com um álcool, geralmente de cadeia curta (metílico ou etílico). Mundialmente, o processo de produção do biodiesel predominante é através da reação de transesterificação metílica.

Para produzir biodiesel é necessária uma fonte de ácido graxo, a qual pode ser proveniente das mais variadas matérias primas, dentre elas citam-se plantas oleaginosas (soja, mamona, palma, amendoim etc.), gordura animal e óleos residuais. Dependendo do processo de produção e purificação do biodiesel, podem ser incorporados ao produto, possíveis contaminantes, tais como a água residual e concentrações de glicerina.

O biodiesel apresenta muitas vantagens em comparação aos combustíveis fósseis. A presença de compostos que podem ser facilmente

reconhecidos pela microbiota, tornam o biodiesel mais biodegradável em comparação a gasolina e ao óleo diesel. O biodiesel pode, também, apresentar quantidades residuais de enxofre e de compostos aromáticos. Assim, quando comparado ao diesel, que possui uma quantidade desses elementos muito maior, sua toxicidade é reduzida.

Outra vantagem são seus teores médios de oxigênio, que favorecem uma combustão mais completa, e seu maior ponto de fulgor, o que torna mais seguro seu armazenamento. Porém uma desvantagem percebida pela comunidade usuária de diesel tipo B, que é o que contém biodiesel em sua formulação, é a sua suscetibilidade à contaminação microbiana durante o armazenamento.

Durante o armazenamento, é possível a formação de água livre resultante principalmente da condensação da umidade do ar no interior dos tanques, que acaba se acumulando no fundo desses tanques. Esta condição pode facilitar o surgimento de uma massa biológica na interface combustível-água, a partir de micro-organismos presentes no combustível, e que são capazes de degradar as cadeias carbônicas tanto do diesel, quanto do biodiesel.

O metabolismo microbiano pode produzir compostos de caráter ácido que tendem a aumentar a corrosão interna dos tanques e a instabilidade química do combustível. O biodiesel produzido a partir de diferentes matérias primas contém proporções de ácidos graxos distintas, com diferentes números de insaturações, resultando em diferentes características deste biocombustível.

Sendo assim, dependendo da matéria prima utilizada na produção de biodiesel, ésteres com propriedades diferentes podem variar de concentrações e, conseqüentemente, alterar características que influenciam na sua degradabilidade. Com isso, o processo de produção, matérias primas e substâncias envolvidas no procedimento, podem auxiliar a compreender o aumento da suscetibilidade do biodiesel à contaminação microbiana.

Algumas medidas simples são propostas para a prevenção do crescimento microbiano nos tanques. Tratam-se das “Boas Práticas”, que incluem principalmente a drenagem diária dos tanques. Em alguns casos, é indicada a aplicação de produtos com características antimicrobianas, que são compostos químicos, orgânicos ou inorgânicos, que podem ser adicionados aos combustíveis, auxiliando a prevenir e controlar a contaminação.

## 2. Objetivo Principal

Avaliar o papel deteriogênico (crescimento e metabolismo) de fungos filamentosos em meio aquoso com biodiesel produzido a partir de óleo de oliva, óleo de soja e óleo de linhaça, durante 120 dias.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento dos fungos *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium aurantiacum* e *Paecilomyces variotii* em quatro tipos de meio mineral, acompanhando a produção de biomassa, medidas de pH e consumo de fosfato, durante 28 dias.

- Analisar o comportamento do biodiesel na presença do meio mínimo mineral e água ultrapura, avaliando a concentração de fosfato, pH e possíveis migrações de ésteres do biodiesel para o meio mineral através de análises por cromatografia gasosa com detector de massas (CGMS).

- Acompanhar o crescimento (biomassa) de fungos filamentosos no meio mineral selecionado e biodiesel (B100) produzido por transesterificação metílica, a partir de óleo de oliva, óleo de soja e óleo de linhaça durante 120 dias, monitorando valores de crescimento, pH, produção de produtos surfactantes e produção de enzima (lipase).

- Estimar a biodegradação do biodiesel pelos fungos com cromatografia gasosa (GC) com um detector de ionização de chama (FID).

- Avaliar a concentração mínima fungistática, fungicida e esporicida de quatro produtos antimicrobianos, indicados para o uso em combustíveis.

### **3. Biodiesel: Produção e Propriedades**

#### **3.1 Importância dos Biocombustíveis**

Em 23 de fevereiro de 1897, Rudolf Diesel (1858-1913), um engenheiro alemão, registrou a patente de seu motor-reator produzido, em 1893, para funcionar com óleos de origem vegetal. Seu invento foi apresentado oficialmente na Feira Mundial de Paris, França, em 1898, e o combustível utilizado nessa época foi o óleo de amendoim.

Após sua morte, a indústria do petróleo passou a chamar um tipo de óleo proveniente do refino do petróleo de óleo diesel e, por ser mais barato que os demais combustíveis na época, passou a ser largamente utilizado nos motores de Rudolf Diesel (Knothe *et al.*, 2006; Demirbas, 2009). Desde o século passado, os combustíveis derivados do petróleo têm sido a principal fonte energética mundial, porém, mais recentemente, preocupações com o meio ambiente impulsionaram muitas pesquisas pela busca de alternativas tecnológicas, capazes de colaborar com um desenvolvimento sustentável.

Os chamados biocombustíveis sofreram um grande impulso na sua utilização a partir dos anos 70, devido principalmente à Crise do Petróleo, e à instalação de Programas de iniciativas do Governo, como o ProÁlcool, em 1975, e o Programa Nacional de Produção de Biodiesel - PNPB, em 2002, sendo que, em 2010, o Brasil ocupou o segundo lugar no ranking de produtores mundiais de biodiesel, ultrapassado apenas pela Alemanha (Nitsch, 1991; Ramos *et al.*, 2003; Leite & Leal, 2007; Feix, 2012).

Atualmente há uma ampla definição do biodiesel, visto que a matéria-prima para sua produção pode ter diferentes origens. Porém, a ANP define o biodiesel, através de sua Resolução nº 14 de 2012, como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais.

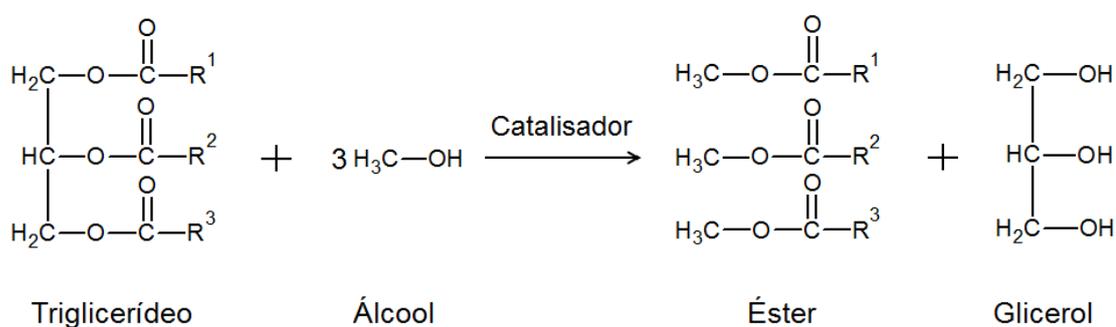
A Lei 11.097/2005, aprovada pelo Congresso Nacional em 13 de janeiro de 2005, tornou mandatória a adição de biodiesel ao diesel de petróleo no Brasil. Inicialmente a proporção de biodiesel adicionada ao diesel era de 2%, denominado de B2, sendo obrigatório seu uso a partir de janeiro de 2008. A partir de 1º de Julho de 2008, a mistura do biodiesel no diesel passou a ser de 3% (B3) e a mistura B5 (5% de adição), que entraria em vigor apenas em 2013, teve o seu início antecipado em janeiro de 2010 (ANP, 2009).

De acordo com a Resolução Nº 42, de 16.12.2009, da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Bicomcombustíveis (ANP), os óleos diesel comercializados são classificados, no Brasil, em óleo diesel A e óleo diesel B. O óleo diesel A é o combustível diesel, proveniente de processos de refino do petróleo e destinado a veículos dotados de motores do ciclo Diesel, sem adição de biodiesel. O óleo diesel B é o óleo Diesel A com a adição de biodiesel no teor estabelecido pela legislação vigente (ANP, 2009), que, conforme já mencionado, é hoje de 5%.

### **3.2 Produção de Biodiesel**

A tecnologia para a produção de biodiesel predominante no mundo é a rota tecnológica de transesterificação que pode ser etílica, mediante o uso do

álcool comum (etanol) ou metílico, através do emprego do metanol (Figura 1). Porém, muitas pesquisas também mostram resultados importantes envolvendo outras metodologias como catalise ácida ou heterogênea, catálise enzimática, produção por craqueamento, e transesterificação com metanol supercrítico (Macedo & Macedo, 2004; Demirbas, 2007; Krause, 2008)



**Figura 1.** Etapas da Reação de Transesterificação Metílica. (Adaptado de Leung & Leung, 2010).

A rota de transesterificação consiste na reação de um ácido graxo com um álcool, geralmente de cadeia curta, comumente metanol (metílico) ou etanol (etílica). O metanol ainda é o mais utilizado por apresentar maior rentabilidade na reação, porém apresenta a desvantagem de ter sua principal origem em fontes fósseis (Teixeira *et al.*, 2010).

Nesse sentido o etanol, proveniente de biomassa renovável, seria mais viável, porém o fato de possuir um carbono a mais que o metanol provoca uma maior facilidade de se misturar à glicerina, o que dificulta a separação das fases biodiesel-glicerina durante o processo de produção (Parente, 2003). O etanol seria vantajoso, também, por outras características que possui, tais

como ser menos tóxico quando comparado ao metanol, ser renovável e produz biodiesel com maior lubricidade e maior número de cetano, o que otimizaria a sua combustão (Parente, 2003; Lôbo *et al.*, 2009).

Na reação de transesterificação são utilizados catalisadores que aumentam a sua velocidade e eficiência. Vários catalisadores ácidos e básicos podem ser utilizados, sendo a catálise alcalina geralmente mais utilizada por ser mais rápida que a ácida, porém a sua utilização depende da natureza dos óleos utilizados na reação (Macedo & Macedo, 2004). Os catalisadores hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH) costumam promover rendimentos satisfatórios em transesterificações (Lôbo *et al.*, 2009).

O que ocorre na transesterificação é a quebra do ácido graxo em glicerol e glicerídeos. Os triglicerídeos reagem com o álcool, formando os ésteres. O glicerol é considerado um resíduo da reação (Macedo & Macedo, 2004) (Figura 1). Após a produção, é necessário, portanto, um processo de purificação, no qual se retiram os resíduos indesejáveis da reação (glicerol, mono, di e triglicerídeos não esterificados, resíduo de álcool e catalisador), produzindo um óleo de menor viscosidade e de aspecto mais fluido.

No método convencional do processo de purificação do biodiesel, o qual utiliza água, existe a possibilidade da geração de concentrações indesejáveis de água residual devido ao grau de higroscopicidade do biodiesel (Lôbo *et al.*, 2009). Um método alternativo à utilização de água, e bastante eficaz, é o uso de sólidos adsorventes, como o silicato de magnésio, que tem se mostrado promissor no processo de purificação da reação de transesterificação (Costa, 2010).

O biodiesel somente é liberado para o mercado após a realização de algumas análises especificadas pela Resolução ANP Nº 14, de 2012 da Agência Nacional de Petróleo (ANP). Caso o biodiesel não venha a ser comercializado no prazo de 30 dias após a emissão do Certificado de Qualidade pelo fabricante, o mesmo deverá ser submetido a algumas análises.

Dentre as análises exigidas estão: teor de éster, a viscosidade cinemática a 40°C, a massa específica a 20°C, teor de água, índice de acidez e estabilidade à oxidação a 110°C. Se a diferença de massa específica a 20°C for superior a 3,0 Kg/cm<sup>3</sup>, deverá ser realizada a recertificação completa do produto (ANP, 2008). O teor de água aceito até a publicação da Resolução Nº 14 da ANP, de 11/05/2012, era de 500mg/Kg pelos Métodos ASTM 6304 e EN ISO 12937. Após esse período, o limite de 380mg/Kg seria admitido até 60 dias após a publicação da Resolução.

No período de 1º de janeiro de 2013 até 31 de dezembro de 2013 o limite máximo estabelecido será de 350mg/Kg e, a partir de 1º de janeiro de 2014, o limite máximo será de 200mg/Kg (ANP, 2012). Os valores de cada análise devem estar de acordo com os limites impostos pelas normas previstas em lei, e são indispensáveis para que o biocombustível tenha o rendimento esperado no motor (Cavalcanti, 2009; Lôbo *et al.*, 2009; Zuniga *et al.*, 2011).

Como energia de fonte renovável, a utilização do biodiesel apresenta vantagens quando comparado a outros tipos de combustíveis, tais como gasolina e óleo diesel, o que destacaremos a seguir. O mesmo pode conter quantidades mínimas de enxofre e de compostos aromáticos, sendo assim, quando comparado ao diesel, sua toxicidade é reduzida (Lôbo *et al.*, 2009). O

biodiesel apresenta teores médios de oxigênio, favorecendo uma combustão mais completa; possui maior ponto de fulgor, o que torna mais seguro seu armazenamento. Sua queima libera menor quantidade de material particulado, e gases como HC, CO e CO<sub>2</sub>, responsáveis pelo efeito estufa. É mais suscetível à biodegradação e mesmo fornecendo uma quantidade de energia 10% menor do que o diesel de petróleo, seu desempenho no motor é o mesmo (Lôbo *et al.*, 2009).

O biodiesel apresenta também algumas desvantagens na sua utilização. Apesar de produzir baixas emissões de materiais sulfurados, os valores de compostos NOX aumentam com a combustão do biodiesel. Além disso, sua instabilidade no armazenamento pode ser um obstáculo à utilização desse biocombustível (Ramos *et al.*, 2003).

### **3.3 Matérias primas**

A fonte de ácido graxo da reação de transesterificação pode ser proveniente das mais variadas matérias primas, dentre elas citam-se as oleaginosas, como soja, mamona, palma e amendoim, gordura animal e óleos residuais (Knothe *et al.*, 2006). Os ácidos graxos podem ser divididos em três famílias diferentes: ômega 3, ômega 6 e ômega 9. Nessas famílias encontramos gorduras poli-insaturadas que fazem parte de um grupo de ácidos graxos essenciais à vida por desempenharem funções biológicas importantes em seres vivos. Dentre eles os ácidos oléico, linoleico e linolênico são bem conhecidos e estudados na literatura quanto à sua importância em organismos (Figura. 2) (Wacker & Elert, 2001; Fassina, 2011).

Óleo de Soja: em 2011 mais de 86% dos 2,67 bilhões de litros de biodiesel produzidos no Brasil foram provenientes do óleo de soja (*Glycine max*), segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), além de ser uma das oleaginosas mais cultivada no Brasil. O perfil de ácidos graxos encontrados no óleo de soja contém uma porcentagem alta de insaturações, sendo que mais de 50% dessa porcentagem é composta pelo ácido linoléico (Tabela 1) (Ferrari *et al.*, 2005).

**Tabela 1.** Porcentagem dos principais ácidos graxos presentes nas matérias primas Linhaça, Soja, Oliva, Amendoim e Sebo Bovino. Adaptado de: Lazzari e Chiantore (1999); Ferrari *et al.* (2005), Oliveira *et al.* (2008) e Krause (2008).

Ácidos Graxos (%)	Óleo de Linhaça	Óleo de Soja	Óleo de Oliva	Óleo de Amendoim	Sebo Bovino
C16:0 Palmítico	6,0 – 7,0	7,0 – 14,0	7,5 – 20,0	7,0 – 12,0	23,0 – 29,0
C18:0 Esteárico	3,0 – 6,0	1,4 – 5,5	0,5 – 3,5	1,5 – 5,0	20,0 – 35,0
C18:1 Oléico	14,0 – 24,0	19,0 – 30,0	56 – 83,0	64,0 – 86,0	26,0 – 45,0
C18:2 Linoléico	14,0 – 19,0	44,0 – 62,0	3,5 – 20,0	4,0 – 15,0	2,0 – 6,0
C18:3 Linolênico	48,0 – 60,0	4,0 – 11,0	<1,5	0,5 – 1,0	<1,0

Várias oleaginosas, como as citadas anteriormente, já tiveram seus óleos convertidos em biodiesel e conseguiram um rendimento muito bom em motores diesel (Pimentel & Patzek, 2005). Porém, no cenário atual, a soja é, ainda, a oleaginosa mais utilizada para a produção de biodiesel no Brasil, por ser a planta que é produzida em quantidades necessárias e disponíveis para

produção imediata em larga-escala de biodiesel (Carneiro, 2003; Parente, 2003).

De forma a diminuir a predominância da soja, muito se apostou em oleaginosas regionais, como a mamona (*Ricinus communis*). Essa matéria prima, porém, acabou não suprimindo a demanda de produção de biodiesel, bem como teve seu sucesso baseado principalmente na inclusão econômica da agricultura familiar da região nordeste brasileira, o que deparou-se com limitações, como tecnologias apropriadas na agricultura familiar (Freitas *et al.*, 2010; Obermaier & La Rovere, 2012).

O biodiesel produzido a partir dessa oleaginosa apresenta viscosidade elevada, o que inviabiliza o seu uso na forma pura, devendo ser misturado a outros óleos para não comprometer o desempenho e durabilidade dos motores (Santos, 2007; Mendes e Costa, 2010; Maia, 2012).

Óleo de Linhaça: O óleo proveniente da semente de Linho (*Linum usitatissimum*) é um óleo vegetal de coloração alaranjada e sabor levemente amargo. A evidência de seus benefícios nutricionais tem impulsionado seu consumo na dieta humana. Com propriedades antioxidantes e imunoestimulante, previne doenças degenerativas, cardiovasculares e apresenta excelentes resultados no tratamento da tensão pré-menstrual e menopausa e na redução dos riscos de câncer de mama, próstata e pulmão. O óleo de linhaça também é usado na indústria, na fabricação de tintas, vernizes e lubrificante de motores, além de ser amplamente estudado como potencial matéria prima para produção de biocombustíveis (Fonseca & Yoshida, 2009; Dixit *et al.*, 2012).

Os ácidos graxos presentes no óleo de linhaça são compostos basicamente por cadeias poli-insaturadas, sendo que mais de 60% são ácidos linolênicos (C18:3) (Nuernberg, 2005; Galvão *et al.*, 2008). Através do processo de transesterificação metílica, as características inerentes aos ácidos graxos componentes do óleo de linhaça são passadas para os ésteres, componente principal do biodiesel. Assim sendo, um biodiesel de óleo de linhaça possui em sua formulação mais de 60% de linolenato de metila.

Óleo de Oliva: Oleaginosa de grande interesse comercial (*Olea europaea*), cujo óleo é extraído do seu fruto chamado azeitona. O óleo de oliva, altamente comercializado em todo o mundo, contém, em sua formulação, uma grande porcentagem de ácidos graxos insaturados, onde o ácido oléico (C18:1) representa em média mais de 50% de sua composição (Oliveira *et al.*, 2008).

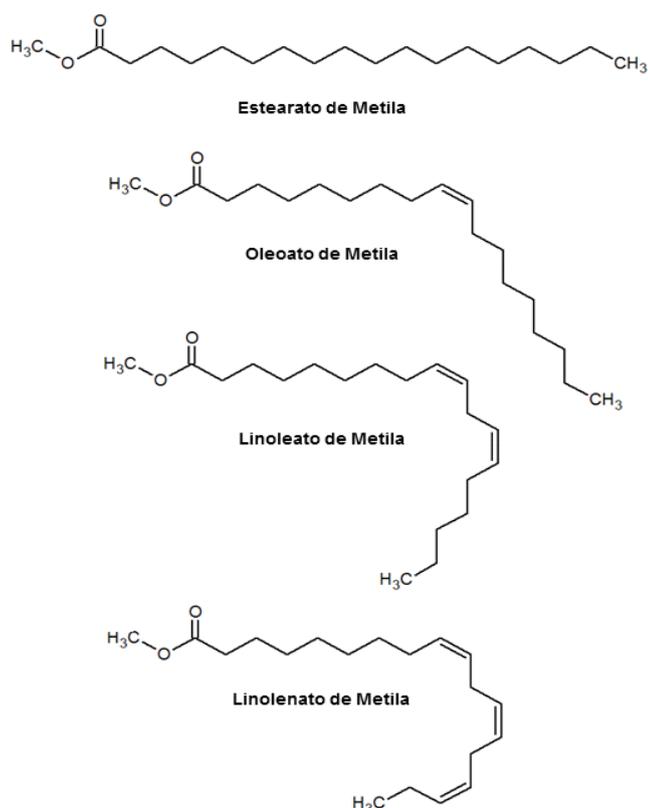
Uma grande porcentagem da produção mundial desse óleo concentra-se nos países Espanha, Itália e Grécia, os quais detêm cerca de 80% do total produzido, seguidos por Síria, Turquia, Tunísia e Marrocos (13% do total produzido) (Pagliuca & Scarpato, 2011).

Além de ser utilizado principalmente na alimentação, o óleo de oliva também é utilizado na indústria cosmética como aditivo base para produção de sabões e cremes, e ainda pode ser usado como precursor de polímeros como por exemplo poliésteres, poliamidas e poliuretanos (Nicolau *et al.*, 2010; Pagliuca & Scarpato, 2011).

O biodiesel, de uma forma geral, é extremamente suscetível a reações de natureza abiótica: hidrolíticas e oxidativas. Quanto maior o grau de insaturação das cadeias carbônicas presentes na matéria-prima maior sua

suscetibilidade à oxidação. Condições como calor, radiação UV, umidade, ar atmosférico e metais, mesmo que por pouco tempo, induzem processos oxidativos, formando radicais livres e liberando aldeídos, ácidos carboxílicos e polímeros (Knothe, 2007).

O biodiesel é composto, basicamente, por oito diferentes ésteres de ácidos graxos (C16-18) metil esterificados, incluindo oleato, palmitato, estearato, linoleato, mirístico, laureato e linolenato, e a concentração de cada éster pode variar de acordo com a fonte de origem do ácido graxo utilizado na reação de transesterificação (Figura. 2) (Murugesan *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Estrutura química dos principais ésteres de ácidos graxos presentes no Biodiesel (Baseado em Suarez *et al.*, 2007).

Algumas matérias primas, como a soja, possuem um perfil de ácidos graxos que 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).

Os principais fatores que afetam a estabilidade química e, em consequência, a potencial degradabilidade do biodiesel são: o comprimento da cadeia, o número de insaturações e a ocorrência de outras funções químicas. O biodiesel pode sofrer reações de natureza hidrolítica, oxidação enzimática, foto – oxidação e autooxidação.

As reações hidrolíticas consistem na hidrólise dos ésteres e são catalisadas pelas enzimas lipases ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres (Barreira-Arellano, 1993). No mecanismo de oxidação enzimática, as reações ocorrem pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, resultando na formação de peróxidos e hidroperóxidos, os quais podem formar gomas insolúveis por meio de polimerização (Graboski & McCormick, 1998; Silva *et al.*, 1999).

O processo de degradação oxidativa do biodiesel pode ser ativado pela luz (foto-oxidação), cujo mecanismo envolve a adição direta de oxigênio (O<sub>2</sub>) aos ácidos graxos insaturados. O O<sub>2</sub> reage diretamente com as duplas ligações presentes no óleo, produzindo hidroperóxidos (Ferrari & Souza, 2009). Por sua vez, essas reações oxidativas podem modificar o pH da fase aquosa de um sistema de armazenamento, acelerando processos corrosivos nos tanques e instabilidade química dos combustíveis (Ambrozin *et al.*, 2009).

Além da foto-oxidação, o biodiesel tende a se oxidar sob a influência de outras condições abióticas como calor, umidade, ar atmosférico e metais. Uma das consequências da oxidação é o aumento da viscosidade do biodiesel, levando a formação de gomas e sedimentos, acarretando o entupimento de filtros e sistemas de injeção (Knothe, 2007).

Algumas medidas podem ser tomadas para aumentar a resistência à degradação oxidativa como a aplicação de substâncias antioxidantes (Domingos *et al.*, 2007; Knothe, 2007; Ferrari & Souza, 2009). Mesmo o biodiesel sendo proveniente de oleaginosas, as quais são dotadas de antioxidantes naturais, o uso de antioxidantes efetivos pode aumentar a estabilidade do biocombustível durante a estocagem. Assim, alguns antioxidantes sintéticos têm sido recomendados, como os TBHQs, que exibem um grande poder estabilizante (Liang *et al.*, 2006; Domingos *et al.*, 2007; Ferrari & Souza, 2009; Xin, 2009).

Entre outras propriedades, o biodiesel apresenta uma grande afinidade com água (higroscopicidade), o que eleva consideravelmente seu teor de água, somente entrando em contato com a umidade do ar (Gerpen *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2006; Lôbo *et al.*, 2009). Vieira *et al.* (2007) utilizando biodiesel de mamona e soja, constataram que em misturas de biodiesel e diesel, a capacidade de absorção de água pela mistura aumenta com o aumento do teor de biodiesel.

Por ser composto por ésteres de ácidos graxos, altamente similares a substâncias encontradas normalmente na natureza, o biodiesel possui maior degradabilidade do que o diesel, cujos constituintes são basicamente

hidrocarbonetos de cadeias longas, incomuns no ambiente, e comparativamente pode ser de mais difícil degradação (Mariano *et al.*, 2008).

Essa propriedade é considerada uma das vantagens ao se adicionar biodiesel ao diesel em relação a contaminação ambiental. Porém, essa característica pode ser uma desvantagem para quem armazena esse combustível, devido a presença de fontes de carbono que podem ser utilizadas pelos micro-organismos para produzir biomassa.

### **3.4 Degradação Biótica**

As propriedades atribuídas ao biocombustível podem influenciar características da nova formulação do diesel, que atualmente recebe a adição de biodiesel obrigatoriamente de 5%. Sendo assim, os processos envolvendo a degradação dessas misturas também podem ser modificados (Zuniga *et al.*, 2011).

Estudos recentes têm avaliado e comparado 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 (B0) 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.

Outros trabalhos, como o realizado por Pasqualino *et al.* (2006), relataram um aumento na biodegradabilidade das misturas de diesel e biodiesel, a medida que ocorre a adição de biodiesel. Isto sugere um efeito

positivo na biodegradação das misturas, ou seja, o biodiesel, ao ser adicionado no diesel, aumentou a biodegradabilidade do diesel, através de transformações cometabólicas.

Schleicher *et al.* (2009) verificaram um maior crescimento de micro-organismos em misturas com 20% de biodiesel de soja, e 80% de diesel (B20), seguido pela mistura B5, e então por B100. Também, Bücken *et al.* (2011), observaram o aumento da biodegradação, por fungos filamentosos e leveduriformes, do combustível diesel, a medida que o percentual de biodiesel aumentou. Mais recentemente, Silva *et al.* (2012) acompanharam a degradação de várias misturas (B5, B20, B50 e B100) em solo com caráter areno-argiloso, coletado em uma região de Mata Atlântica. O aumento da degradação dos contaminantes a partir da utilização da mistura B20, foi observado.

#### **3.4.1 Principais Micro-organismos Deteriogênicos**

A participação de micro-organismos como um dos agentes na deterioração de combustíveis vem sendo relatada na literatura desde 1895. Myosche (1895) fez o primeiro relato de utilização de compostos considerados de difícil degradação por micro-organismos, observando o crescimento do fungo *Bothritis cinerea* em parafina (Myosche, 1895, *apud* Bento, 2001).

Para que um microrganismo utilize, como fonte de carbono, substâncias como hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos presentes nos combustíveis, é imprescindível que essas frações estejam disponíveis, e, pela atividade enzimática, eles sejam capazes de transformar as complexas

moléculas dos contaminantes em intermediários comuns que possam ser incorporados às suas rotas catabólicas (Van Hamme *et al.*, 2003; Jacques *et al.*, 2007).

Vieira *et al.* acompanhou, em 2006, 25 isolados bacterianos degradadores de óleo diesel e seus efeitos sobre biodiesel de óleo de palma, sendo que 16 dos 25 isolados apresentaram pelo menos uma atividade enzimática durante o crescimento em óleo de palma como fonte de carbono.

No Brasil, a primeira referência de estudos envolvendo os sedimentos formados em tanques de estocagem de combustível foi realizada por Gutheil (1966) com o isolamento do fungo *Cladosporium resinae* de tanques de querosene. Desde então, outros micro-organismos foram isolados de tanques de armazenamento e tiveram suas capacidades deteriogênicas comprovadas, como, por exemplo, leveduras e fungos filamentosos dos gêneros *Candida viswanathii*, *Hormoconis resinae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e seu teleomorfo *Neosartorya*, *Paecilomyces variotii*, *Candida silvícola*, e *Pseudallescheria boydii*, entre outros (Bento & Gaylarde, 1996; Janda Ulfi *et al.*, 1999; Bento & Gaylarde, 2001; Passman, 2003; Miranda *et al.*, 2007; Oliveira, 2008; Taewoo *et al.*, 2011).

Entre as bactérias aeróbias citam-se os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* (Gaylarde *et al.*, 1999; Bento & Gaylarde, 2001; Passman, 2003; Vieira *et al.*, 2006; Malik & Ahmed, 2012). A presença de bactérias anaeróbias, como as bactérias redutoras de sulfato (BRS) e bactérias

denitrificantes (BDN), também já foram detectadas em combustíveis (Gaylarde *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 2011).

### **3.5 Condições para o Crescimento Microbiano**

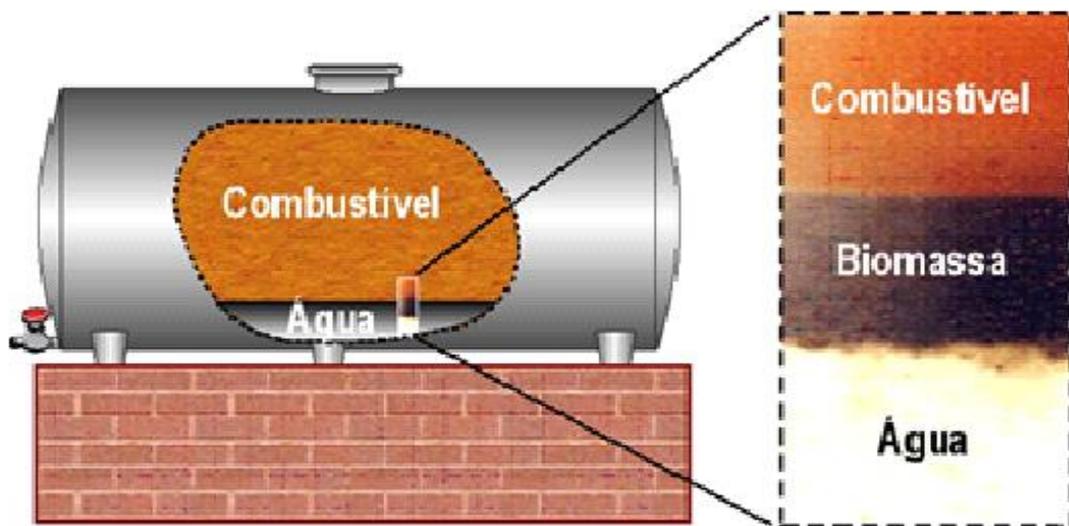
A contaminação microbiana de combustíveis armazenados, e seu consequente crescimento, são influenciados por diversos fatores, que apresentam características e origens bastante distintas. A capacidade microbiana de utilizar o combustível como fonte de carbono também é um fator de grande importância para seu crescimento (Bento *et al.*, 1999; Gaylarde *et al.*, 1999; Luz *et al.*, 2011).

#### **3.5.1 Água**

A presença de água é fundamental para início do desenvolvimento microbiano, e num sistema com combustível estocado ela pode estar presente em duas fases distintas: como água livre, decantada no fundo do tanque e denominada água de lastro, e em pequenas quantidades de água dissolvida no próprio combustível (Figura 3) (Hill & Hill, 2008; Passman, 2013).

Essa água entra no tanque de armazenamento de várias formas, como, por exemplo, condensada nas paredes do tanque, por defeitos na vedação que podem deixar passar água do exterior para o interior do sistema durante operações de carga e descarga e da própria água que acompanha o combustível desde sua produção (Gaylarde *et al.*, 1999; Van Hamme *et al.*, 2003, Meneghetti *et al.*, 2013).

A água presente nos sistemas de armazenamento pode conter nutrientes como, por exemplo, fósforo, nitrogênio e potássio, fatores limitantes do crescimento microbiano. Por outro lado, os próprios aditivos usados em muitos combustíveis muitas vezes carregam sais orgânicos como parte de sua formulação, e que podem ser utilizados como fontes de nutrientes pelos micro-organismos (Smith, 1991; Gaylarde *et al.*, 1999; Bento, 2001; Passman, 2013).



**Figura 3.** Representação de um tanque aéreo de combustível contaminado.

Fonte: Bento *et al.*, 2006.

### 3.5.2 Competência Enzimática

Para que o processo de biodegradação se desenvolva é necessário que no sistema existam micro-organismos capazes de utilizar o combustível estocado como fonte de carbono. A população microbiana competente em degradar esses substratos, pode entrar em contato com o combustível, num tanque de armazenamento, através do sistema de ventilação ou de

bombeamento, pois são micro-organismos comumente presentes no ambiente (Yemanshova *et al.*, 2007).

Ao encontrar condições apropriadas de água e de nutrientes, essa população microbiana 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, entre as fases oleosas e aquosa, e até mesmo formar biofilmes nas paredes do tanque (Chung *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2006; Yemanshova *et al.*, 2007; Schultz, 2010).

Uma vez estabelecida uma condição favorável e iniciado o crescimento, esses organismos formam uma terceira fase visivelmente distinta das outras duas, descritas anteriormente, no tanque (Figura 3). Dentre os micro-organismos encontrados nessa biomassa formada na interface óleo-água, estão presentes fungos filamentosos, leveduras e bactérias.

Além de material celular vivo e morto, nela encontramos também substâncias orgânicas e inorgânicas, provenientes do metabolismo microbiano, como por exemplo, ácidos orgânicos, produzidos por fungos, e H<sub>2</sub>S produzido por bactérias redutoras de sulfato (Bento & Gaylarde, 1996; Bento, 2001; Bucker, 2010).

A formação dessa biomassa resulta em consequências, como, por exemplo, obstrução de tubulações, filtros e mangueiras do sistema de abastecimento; aumento do conteúdo de água, e a geração de produtos biossurfactantes, resultantes do metabolismo microbiano, que causam a emulsão do hidrocarboneto na água.

Muitas vezes, dependendo do grau de contaminação do tanque, pode-se observar o escurecimento da água de lastro, devido à precipitação de sulfeto de ferro, e possível formação de ácido sulfídrico, devido à atividade de bactérias anaeróbias como as redutoras de sulfato (Bento & Gaylarde, 2001; Passman, 2003).

Os sedimentos químicos formados, durante o processo de degradação, estão relacionados à natureza do combustível e as reações de hidrólise e oxidação, as quais provocam a degradação do produto. Durante a degradação de hidrocarbonetos há formação de ácidos orgânicos, como ácido propiônico, que podem reduzir as medidas de pH da fase aquosa como verificado por Bento *et al.* (2005), em que foram encontrados valores de pH de 4,8 ao final de 60 dias de estocagem simulada em laboratório. Gomes *et al.* comparou em 2009 a degradação de querosene pelas leveduras *Trichosporon pullulans* e *Rhodotorula aurantiaca* e em ambos os tratamentos após 6 dias de experimento o pH da fase aquosa reduziu de 7,0 para 3,0 a 6,0.

### **3.6 Degradação Microbiana de Combustíveis**

Os combustíveis são compostos por hidrocarbonetos suscetíveis à degradação microbiana que podem estar sob a forma de cadeias alifáticas, aromáticas, longas, curtas, lineares ou ramificadas, capazes de serem biotransformadas para a obtenção de compostos usados no metabolismo celular. No entanto, além da competência enzimática, é importante que os hidrocarbonetos estejam acessíveis ao microrganismo.

Neste sentido, a biodisponibilidade é considerada um fator importante para a degradação do combustível. O caráter solúvel dos componentes alifáticos decresce rapidamente com o aumento da massa molecular. Hidrocarbonetos com cadeia carbônica longa são de difícil solubilização, e, portanto, há a necessidade de adaptações por parte dos micro-organismos. O contato com o hidrocarboneto, e a consequente degradação do substrato, são dependentes dessas adaptações para alcançar uma taxa de assimilação suficientemente alta, satisfazendo as necessidades de crescimento do microrganismo (Bento, 2001; Reginatto *et al.*, 2011).

O processo de biodegradação de hidrocarbonetos se inicia nas moléculas com estrutura química mais simples, ou seja, nos *n*-alcanos. Em aerobiose, a ordem preferencial de degradação dos hidrocarbonetos derivados de petróleo é a seguinte: *n*-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de baixa massa molecular > ciclo alcanos > aromáticos de alta massa molecular (Vieira *et al.*, 2006).

A atividade metabólica dos micro-organismos pode mudar a estrutura química dos compostos (biotransformação) para moléculas mais simples encontradas no ambiente. E em alguns casos pode haver a mineralização dos mesmos, isto é, pode-se gerar, após todo o processo, dióxido de carbono e água (Atlas & Bartha, 1996; Van Hamme *et al.*, 2003; Jacques *et al.*, 2007).

Os passos iniciais da degradação de hidrocarbonetos alifáticos se resumem na oxidação dos grupos metila das extremidades a álcoois primários, os quais são oxidados a aldeídos, que, por sua vez, são oxidados aos ácidos

graxos correspondentes. Os ácidos graxos formados entram na via de oxidação dos ácidos graxos, processo de degradação conhecido por  $\beta$ -oxidação ou acabam sendo utilizados pela célula através das rotas metabólicas comuns (Sharma & Pant, 2000; Bento, 2005).

Segundo Mehdi & Giti (2008), a velocidade de biodegradação depende da concentração e da composição do óleo, da sua biodisponibilidade no meio, dos tipos de micro-organismos presentes e de um grupo de moléculas, denominadas biossurfactantes, que, de acordo com Bento *et al.* (2008), são moléculas anfipáticas, ou seja, possuem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica.

Os biossurfactantes podem afetar a velocidade de biodegradação de hidrocarbonetos de duas formas: (1) aumentando a solubilização das moléculas na fase aquosa, e (2) modificando a afinidade entre as células dos micro-organismos e os hidrocarbonetos, ao aumentar a hidrofobicidade celular, modificando assim o acesso da comunidade microbiana ao contaminante em questão (Yuste *et al.*, 2000; Mehdi & Giti, 2008; Paria, 2008).

Devido a sua estrutura química, essas moléculas posicionam-se preferencialmente entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio (como nas interfaces óleo/água, água/ar e superfícies), facilitando assim, a emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água. Permitem então, que os micro-organismos utilizem esses substratos como fonte de carbono em seu metabolismo, pela redução da tensão superficial (Nitschke & Pastore, 2002; Bento *et al.*, 2008).

Ao reduzir a tensão superficial e promover a solubilização dos hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, moléculas surfactantes facilitam o crescimento dos micro-organismos nestes substratos (Desai & Banat, 1997; Banat *et al.*, 2000; Mulligan, 2005; Singh *et al.*, 2007).

Muitos micro-organismos produzem substâncias surfactantes capazes de reduzir a tensão superficial da água ( $73 \text{ mN.m}^{-1}$ ) para menos de  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ ), como, por exemplo, o liposan produzido pela levedura *Candida lipolytica*, a surfactina produzida pela bactéria *Bacillus subtilis*, e os ramnolipídeos produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e muitos outros (Cirigliano & Carman, 1985; Bodour & Maier, 2003; Sarubbo *et al.*, 2007).

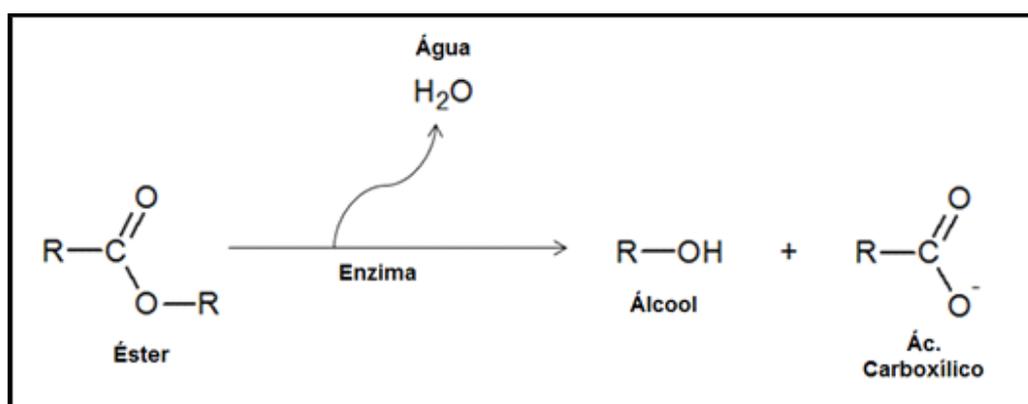
Alguns genes responsáveis pela produção dessas substâncias por micro-organismos já foram identificados, como por exemplo, o gene *sfp* envolvido na produção de surfactina em *Bacillus subtilis* (Nakano *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2000). Os genes do grupo RHL envolvidos na produção e controle da produção de ramnolipídeos presentes em *Pseudomonas* sp. (Maier & Chávez, 2000; Marchant & Banat, 2012). Porém ainda há muito que esclarecer quanto à expressão gênica desses metabólitos e condições responsáveis por essa expressão em outras espécies.

Outros fatores que influenciam a produção desses metabólitos secundários por micro-organismos são a origem da fonte de carbono e nitrogênio, a presença de fósforo, ferro e outros minerais, o valor do pH, a temperatura, e a oxigenação do meio (Nitschke & Pastore, 2002; Bento, 2005; Fontes *et al.*, 2008; Onwosi & Odibo, 2012).

### 3.6.1 Biodegradação de Biodiesel

A rota para a biodegradação do biodiesel por micro-organismos consiste inicialmente da hidrólise do metil ou etil éster por uma esterase (ou lipase), produzindo um ácido graxo e um álcool (Figura 4). As lipases, juntamente com as esterases, fazem parte de uma classe de enzimas denominada hidrolases, as quais catalisam reações de hidrólise.

As lipases em especial, possuem uma capacidade de atuarem na interface óleo/água, catalisando as reações de hidrólise de triacilglicerídios, resultando na formação de mono e diacilglicerídios, ácidos graxos e glicerol. Essa capacidade é conhecida por ativação interfacial, em que, na presença da interface entre óleo e a água, sua conformação modifica-se, tornando o sítio ativo mais disponível à reação de hidrólise (Verger, 1997; López-Gallego *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Hidrólise de ligação éster catalisada por lipases ou carboxilesterases (Baseada em Santos, 2009).

Vários genes responsáveis pela expressão dessas enzimas já foram descritos e suas sequências de nucleotídeos podem ser extremamente diversas, e, assim, podem ter diferentes atividades enzimáticas. O número e a função das lipases podem diferir entre espécies, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida parapsilosis* possuem três lipases intracelulares (Tgl3p, Tgl4p e Tgl5p). *Yarrowia lipolytica*, no entanto, pode possuir apenas duas lipases (Tgl3p e Tgl4p) codificadas por genes LIP (Beopoulos *et al.*, 2011).

Muitos micro-organismos já foram identificados como produtores de lipases e entre os fungos filamentosos temos vários exemplos como *Aspergillus* sp., *Fusarium graminearum* (Nguyen *et al.*, 2010), *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., entre outros (Rapp & Backhaus, 1992; Cardenas *et al.*, 2001; Bornscheuer *et al.*, 2002; Mohanasrinivasan *et al.*, 2009; Griebeler *et al.*, 2011).

As lipases estão envolvidas na hidrólise de ésteres, glicerinas e ácidos graxos de cadeia longa. Ambas as enzimas, lipases e esterases, são capazes de catalisar a hidrólise de ésteres, embora apenas as lipases possuam a capacidade de atuar sobre ésteres insolúveis em água. Entre outras características que as diferem, podemos observar que as esterases agem em ésteres solúveis em água, e não possuem a ativação interfacial, típica das lipases.

A maioria das lipases hidrolisa os mesmos substratos que as esterases, e, atualmente há relatos de que o inverso também pode ocorrer, o que dificulta a classificação dessas enzimas baseando-se somente nas características que apresentam (Jaeger *et al.*, 1999; Lopes *et al.*, 2011).

Após a hidrólise do metil-éster em ácido graxo e um álcool, em micro-organismos eucariotos como fungos filamentosos e leveduras, a porção acil do ácido graxo ativado é transportada ao interior da mitocôndria, sendo esta a etapa regulatória da  $\beta$ -oxidação. Os ácidos graxos de cadeia curta e média atravessam diretamente as membranas da mitocôndria e são ativados no interior da mesma.

Deste modo a acil-CoA presente na mitocôndria é oxidada pela via denominada  $\beta$ -oxidação que consiste da oxidação do carbono  $\beta$  através de uma série cíclica de 4 reações (oxidação, hidratação, oxidação e clivagem) ao final das quais a acil-CoA é encurtada de dois carbonos que são liberados na forma de acetil-CoA com a produção de FADH<sub>2</sub> e NADH (Zhang *et al.*, 1998; Marzzoco & Bayardo, 2007).

Este processo de encurtamento da molécula continua até o ácido inicial ser degradado completamente a acetil-CoA (Chapelle, 2001). Cada volta da  $\beta$ -oxidação há produção de 1 NADH, 1 FADH<sub>2</sub>, 1 acetil-CoA e 1 acil-CoA com dois átomos de carbono a menos. Estes intermediários são metabolizados no Ciclo de Krebs (cada acetil-CoA gerando 3 NADH, 1 FADH<sub>2</sub> e 1 GTP) e na Fosforilação oxidativa onde NADH e FADH<sub>2</sub> são usados para a síntese de ATP.

Para os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono na última etapa da  $\beta$ -oxidação forma-se propionil-CoA que depois é convertido em succinil-CoA e direcionado prioritariamente ao Ciclo de Krebs (Marzzoco & Bayardo, 2007; Alberts, 2010; Lehninger *et al.*, 2011).

A sequência de oxidação é comum para ácidos graxos saturados. No entanto, a maioria dos ácidos graxos provenientes de plantas oleaginosas são insaturados, tendo uma ou mais ligações duplas. Estas ligações estão na configuração *cis* e não podem ser desfeitas pela enzima enoil-CoA hidratase. Para isso, duas enzimas auxiliares são necessárias, uma isomerase e uma redutase que catalisam uma isomerização *cis-trans*.

Para os ácidos graxos monoinsaturados, os ciclos de oxidação acontecem até atingir a ligação dupla *cis*. A enzima enoil-CoA isomerase realiza a conversão da ligação dupla *cis* em *trans* e permite que o ciclo de  $\beta$ -oxidação continue normalmente (Marzzoco & Bayardo, 2007; Alberts, 2010; Lehninger *et al.*, 2011).

Para os ácidos graxos poliinsaturados a 2,4-dienoil-CoA redutase também participa juntamente com a enoil-CoA isomerase alternadamente para a conversão das ligações duplas *cis* em *trans* propiciando a orientação correta das ligações duplas e permitindo a continuidade da  $\beta$ -oxidação (Marzzoco & Bayardo, 2007; Lehninger *et al.*, 2011).

### **3.7 Fungos Degradadores de Combustíveis**

#### **3.7.1 Crescimento e fisiologia**

Os fungos são organismos eucariontes com ampla variedade morfológica e crescem formando colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. As colônias leveduriformes possuem aparências pastosas ou cremosas, formadas por micro-organismos unicelulares.

As colônias filamentosas, além de apresentarem crescimento radial, podem também exibir texturas diversas, desde algodonosas, aveludadas, até pulverulentas; são constituídas fundamentalmente por elementos multicelulares, chamadas hifas, que podem ser contínuas (cenocíticas) ou possuírem septos entre uma célula e outra (septadas) (Loguercio-Leite *et al.*, 2006; Höfling & Gonçalves, 2008).

São encontrados nos mais variados ambientes, mesmo naqueles onde as condições de vida são completamente adversas. Sua importância nos ecossistemas se dá principalmente pelo fato de contribuírem para a decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (Alexopoulos *et al.*; 1996; Trabulsi & Alterthum, 2008; Fukasawa *et al.*, 2009).

Algumas leveduras podem apresentar metabolismo diferenciado, sendo aeróbias facultativas e realizando fermentação quando se desenvolvem em ambientes com pouco oxigênio (Bigaton, 2010; Pratt *et al.*, 2012).

Essa plasticidade metabólica já é muito bem explorada pela indústria, o exemplo disso é que algumas leveduras, como as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora guilliermondii*, são empregadas em processos industriais importantes como a fabricação de bebidas e na produção de compostos de aroma acetoina com potencial utilização na indústria, respectivamente (Mello, 2001; Badotti *et al.*, 2010; Carvalho & Zambiasi, 2011).

Outros fatores são considerados muito importantes para o crescimento fúngico, como por exemplo, temperatura, pressão osmótica e pH do meio. A faixa de temperatura que possibilita o crescimento desses micro-

organismos é muito ampla, mas 25°C é considerado a temperatura média, que todos os fungos conseguem se desenvolver (Kavanagh, 2011).

Ainda que o pH mais adequado ao crescimento dos fungos esteja entre 5 e 7, a maioria dos fungos tolera amplas variações no pH. Os fungos filamentosos, por exemplo, podem crescer na faixa entre 1,5 e 11, porém os leveduriformes não toleram pH alcalino (Singh, 2006; Colauto *et al.*, 2008; Trabulsi & Alterthum, 2008; Kavanagh, 2011).

### **3.7.2 Exoenzimas fúngicas**

Os fungos produzem uma ampla variedade de enzimas degradadoras, que, quando liberadas no ambiente (exoenzimas) podem levar à completa mineralização de moléculas orgânicas ou inorgânicas, ou ainda disponibilizar compostos, produtos de degradação para outros organismos, como bactérias.

O sistema enzimático fúngico é um sistema bastante complexo, com capacidade para degradar moléculas recalcitrantes na natureza, que são encontradas fazendo parte de resíduos vegetais, como, por exemplo, a lignina e compostos xenobióticos, como benzeno, benzopireno, antraceno e naftaleno (Hencklein *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2010; Arun & Eyini, 2011). O potencial degradador dos fungos aumenta quando comparados a outros micro-organismos, pois são adaptáveis a características ambientais extremas (Magan, 1997; Singh, 2006; Loro *et al.*, 2012).

Na degradação de óleos combustíveis algumas outras enzimas estão envolvidas, como as oxigenases, que é um exemplo das classes de

enzimas que são necessárias para que um micro-organismo utilize esses compostos como fonte de carbono.

A classe de enzimas denominadas hidrolases, como lipases e esterases, possui um papel fundamental no início da degradação do biodiesel. Essas enzimas destacam-se por sua estabilidade em solventes orgânicos, alta especificidade com relação ao substrato e o não requerimento de cofatores para a reação (Whiteley *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004, Hasan *et al.*, 2006).

A classe das enzimas lipases hidrolisam triglicerídeos em interfaces óleo-água e está posicionada apenas atrás de proteases e carbohidrases no mercado mundial de enzimas, possuindo cerca de 5% de todo esse mercado (Vaklu & Kour, 2006).

A degradação aeróbia de hidrocarbonetos, que são encontrados nos combustíveis fósseis é considerada mais rápida e completa e envolve a ação das oxigenases (Das & Chandran, 2010; Pazmiño *et al.*, 2010). A maior parte dos micro-organismos oxidam os hidrocarbonetos através de enzimas da classe das monooxigenases, as alcanos hidroxilases, as quais catalisam a adição de um grupo hidroxila nas regiões terminais, subterminais ou biterminais da cadeia hidrocarbônica (Funhoff & Van Beilen, 2006; Hamamura *et al.*, 2008).

Por outro lado, nos mecanismos de degradação envolvendo enzimas dioxigenases, os alcanos são convertidos em hidroperóxidos e subsequentemente reduzidos a alcoóis correspondentes (Fritsche & Hofrichter, 2000; Haritash & Kaushik, 2009). As moléculas resultantes da ação enzimática são então transformadas em intermediários das rotas comuns do metabolismo microbiano, via ciclo do ácido cítrico (Bamforth & Singleton, 2005).

Alguns micro-organismos já possuem sua capacidade deteriorogênica bem explorada pela literatura, porém alguns aspectos ainda necessitam explicações e, portanto, são continuamente alvos de estudos pela comunidade científica.

Schultz (2010) acompanhou o crescimento do fungo *Pseudallescheria boydii*, entre outros micro-organismos, em meio mineral e diesel, e encontrou resultados de crescimento constante nos tratamentos, bem como a produção das enzimas lipase, monoxigenase e dioxigenase, o que o caracteriza como um possível degradador de diesel.

Além disso, alguns estudos já descreveram sua capacidade de degradação de dioxina, um organoclorado altamente carcinogênico, com remoção final de 92% desse contaminante em sistemas de biorreatores (Ishii & Furuichi, 2007). Cazarolli *et al.* (2012) monitorou o crescimento do isolado *P. boydii* em biodiesel de sebo bovino e constatou que a forma de produção do biodiesel interferiu na produção de biomassa pelo fungo, sendo que o biodiesel de sebo bovino, cuja produção foi utilizado com o catalisador KOH promoveu o maior crescimento, em relação ao biodiesel de sebo bovino produzido com o catalisador NaOH.

Outros fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Hormoconis resiniae* e *Candida silvícola*, foram isolados através da filtração dos sedimentos biológicos presentes em tanques de armazenamento do combustível diesel (Bento *et al.*, 2005).

Por essa mesma técnica de filtração, o isolado *Paecilomyces variotii* foi isolado de amostras de biodiesel de soja e identificado por estudos

morfológicos analisados em microcultivo (Bücker *et al.*, 2011). Outras espécies de *Aspergillus* foram descobertas em tintas à base de água (Bach & Rangel, 2005). Alguns micro-organismos do gênero *Penicillium* sp. foram isolados do herbicida 2,4-D, químico amplamente utilizado na agricultura (Guedes, 2010). *Mucor plumbeus*, *Penicillium adametzii* e *Eupenicillium hirayamae*, entre outros fungos, foram encontrados em pentaclorofenol, etc (Carvalho *et al.*, 2009).

Esses micro-organismos podem entrar no sistema de armazenamento de combustível via ar, água de lavagem poluída, tubulações contaminadas ou proveniente do biofilme formado nas paredes dos tanques, e, de posse de um sistema metabólico, como o descrito anteriormente, com capacidade e plasticidade suficientes, conseguem crescer e degradar o combustível estocado, diminuindo o tempo de armazenagem do produto (Gaylarde *et al.*, 1999).

Outros fatores são muito importantes para o crescimento fúngico, como por exemplo, temperatura, pressão osmótica e pH do meio. A faixa de temperatura que possibilita o crescimento desses micro-organismos é muito ampla, mas 25°C é considerado a temperatura média, que todos os fungos conseguem se desenvolver (Kavanagh, 2011).

Ainda que o pH mais adequado ao crescimento dos fungos esteja entre 5, 6 e 7, a maioria dos fungos tolera amplas alterações no pH. Os fungos filamentosos, por exemplo, podem crescer na faixa entre 1,5 e 11, porém os leveduriformes não toleram pH alcalino (Singh, 2006; Colauto *et al.*, 2008; Trabulsi & Alterthum, 2008; Kavanagh, 2011).

### 3.7.3 Necessidades energéticas

Os fungos são considerados quimiorganotróficos, ou seja, obtêm sua energia e fonte de carbono da quebra de compostos orgânicos e possuem basicamente as mesmas necessidades energéticas principais que outros micro-organismos: nitrogênio, fósforo e carbono (Kavanagh, 2011).

As fontes de carbono preferenciais são carboidratos simples, como D-glicose e os sais minerais como sulfatos e fosfatos, porém na falta destes, são capazes de utilizar carbonos de outras substâncias mais recalcitrantes, como hidrocarbonetos aromáticos (Jonathan & Fasidi, 2001; Prenafeta-Boldu *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2010; Tortora *et al.*, 2011; Kennes & Veiga, 2012).

Oligoelementos, como ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio são necessários em pequenas quantidades e agem como cofatores enzimáticos. Alguns fungos requerem fatores de crescimento que não conseguem sintetizar, em especial vitaminas como tiamina, biotina, riboflavina, ácido pantotênico, etc (Cardoso *et al.*, 2009; Kavanagh, 2011).

Uma das formas utilizadas para o isolamento de micro-organismos degradadores de um determinado contaminante é o método de enriquecimento. Nesta técnica, utiliza-se um meio mínimo mineral, como suporte de sais minerais, e a adição de um dado composto orgânico é oferecido como a única fonte de carbono e energia.

Bushnell & Haas, em 1941, confeccionaram um meio mineral simples com o objetivo de isolar os micro-organismos capazes de usar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Esses autores concluíram que algumas substâncias como

petróleo, querosene, gasolina, óleos minerais e a parafina poderiam ser utilizadas como fonte de carbono por diversos micro-organismos (Bushnell & Haas, 1941; Bücken *et al.*, 2011; Simons *et al.*, 2012; Prince *et al.*, 2013).

Outros meios foram confeccionados com a função de suporte mineral, como os meios Richard e Vogel, Tanner, Kaufmann e Kearney e Bastiens, entre outros, sendo a diferença entre eles é a concentração de minerais que cada meio possui (Kaufmann & Kearney, 1965; Shuttleworth & Cerniglia, 1996; Richard & Vogel, 1999; Bastiens *et al.*, 2000).

A finalidade desses meios é auxiliar no isolamento e crescimento de micro-organismos, dando-lhes os macro e micronutrientes necessários para seu desenvolvimento e, em contrapartida, a fonte de carbono virá da substância a ser testada para sua biodegradabilidade.

### **3.8 Contaminação Microbiana em Combustíveis**

Na maioria dos casos, os problemas relacionados com a contaminação microbiana somente são detectados quando há danos visíveis nos equipamentos ou problemas como corrosão dos tanques, que pode ocasionar vazamentos para o ambiente do combustível estocado (Beech & Gaylarde, 1999; Ambrozin *et al.*, 2009; Little *et al.*, 2011).

A deterioração do combustível é caracterizada pelas alterações nas propriedades químicas (degradação das cadeias hidrocarbônicas) e físicas, com a produção de sólidos visíveis (Bento *et al.*, 1999; Ambrozin *et al.*, 2009; Dodos *et al.*, 2012). A degradação química é percebida pela formação de sólidos solúveis, no caso do diesel, que causam escurecimento do combustível

e posteriormente sólidos insolúveis, como as gomas (Batts & Fathoni, 1991; Cid *et al.*, 1994; Knothe & Dunn, 2003).

A atividade microbiana também pode contribuir para o aumento da instabilidade química dos hidrocarbonetos, acelerando as reações que produzem mais sedimentos químicos no sistema de armazenamento. As principais consequências do crescimento microbiano estão apresentadas na tabela 2 (Bento & Gaylarde, 2001; Passman, 2003; Ambrozin *et al.*, 2009; Hill & Hill, 2009).

**Tabela 2.** Principais problemas relatados e grupo de micro-organismos relacionados na contaminação microbiana de sistemas de armazenamento de combustíveis. Fonte: Gaylarde *et al.*, 1999.

<b><i>Principais Problemas Relatados</i></b>	<b><i>Micro-organismos Relacionados</i></b>
Bloqueio de tubulações, válvulas, filtros	Fungos, Bactérias produtoras de polímeros
Aumento do conteúdo de água	Bactérias, fungos e leveduras
Formação de Borrões e sólidos em suspensão no combustível	Bactérias, fungos e leveduras
Produção de surfactantes, causando emulsificação do óleo/água	Fungos, Bactérias Aeróbicas
Corrosão dos tanques de estocagem e tubulações	Fungos, Bactérias Anaeróbicas
Aumento teor de enxofre do combustível	Bactérias Redutoras de Sulfato
Vida mais curta de partes do motor	Indeterminado
Comprometimento da Qualidade do produto	Bactérias, fungos e leveduras

O crescimento microbiano pode propiciar a formação de biofilmes nas paredes dos tanques e seu metabolismo pode também acelerar processos

de corrosão das superfícies metálicas a que estão aderidos e de outros componentes do sistema (Gaylarde *et al.*, 1999; Bento *et al.*, 2005; Marangoni, 2010; Lin & Ballim, 2012).

O uso de aditivos no combustível, com características emulsificantes, pode promover a dispersão de material biológico (biofilmes) aderido nas paredes dos tanques, o que leva à saturação dos elementos filtrantes do sistema e a uma maior exposição do metal, tornando-o mais suscetível ao processo de corrosão, além de disponibilizar mais material orgânico aos micro-organismos presentes em um sistema contaminado (Batts & Fathoni, 1991; Bento & Gaylarde, 1996; Hill & Hill, 2009).

### **3.8.1 Medidas de Controle do Crescimento Microbiano**

Durante o armazenamento, os combustíveis estão suscetíveis a contaminações químicas e biológicas, que podem comprometer a qualidade final do produto. Neste sentido, a água é considerada o principal fator que desencadeia o crescimento de micro-organismos deteriorogênicos (Bento *et al.*, 2006).

Como medidas preventivas e ditas físicas são indicadas: procedimentos de limpeza e drenagens regulares que impedem o acúmulo da água formada nos lastros (Gaylarde *et al.*, 1999; Passman, 2003; Hill, 2008; Siegert, 2009; Coimbra *et al.*, 2012; Rajasekar *et al.*, 2012). Trata-se de uma forma estratégica no controle da multiplicação microbiana, assim como o monitoramento microbiológico é sugerido para a determinação dos micro-

organismos viáveis presentes no combustível armazenado (Gaylarde *et al.*, 1999; Chesneau, 2000; Passman, 2003; Bento *et al.*, 2010).

Desde a introdução de biodiesel ao diesel, tem-se percebido uma maior suscetibilidade desta nova mistura (diesel/biodiesel) à biodeterioração e a instabilidade química, o que leva a um aumento na geração de sedimentos de natureza biológica e/ou química, comprometendo a qualidade final do produto armazenado (Bento *et al.*, 2006; Mariano *et al.*, 2008; Klinksporn, 2009; Siegert, 2009; Bücker *et al.*, 2010; Zimmer *et al.*, 2011; Dodos *et al.*, 2012).

O controle do desenvolvimento de populações deteriogênicas pode ser feito, também, através da aplicação de agentes antimicrobianos (antimicrobianos), uma medida química que auxilia na eliminação ou redução da população microbiana. 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; Passman, 2003; Passman & Dobranick, 2005; Hill & Hill, 2008; Zimmer *et al.*, 2011).

Os antimicrobianos são produtos químicos de composição variada (compostos inorgânicos e orgânicos), utilizados para desinfetar, ou esterilizar objetos e superfícies, e preservar materiais de processos da degradação microbiana (Chapman, 2003; Myers, 2008). Muitas moléculas são utilizadas com esse propósito em combustíveis armazenados, dentre elas podemos citar isotiazolonas, aldeídos, oxazolidinas, hexahidrotiazinas e imidazóis (Gaylarde *et al.*, 1999; Browne, 2011; Rajasekar *et al.*, 2012; Raikos *et al.*, 2012, Passman, 2013).

A natureza dos antimicrobianos permite que eles 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 antimicrobianos oxidantes consiste em oxidar compostos constituintes das células microbianas, sendo conseqüentemente efetivos contra quase todos os tipos de micro-organismos.

Os antimicrobianos não-oxidantes, que englobam uma enorme variedade de compostos orgânicos, exercem atividade antimicrobiana atuando sobre os micro-organismos por interferência em seu metabolismo e/ou pela desintegração da parede celular, inibindo enzimas ou desnaturando proteínas (Gaylarde, 1995; Russel, 2003; Myers, 2008).

Assim, dependendo de suas características, o modo de ação do antimicrobiano 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).

As características de um produto antimicrobiano ideal incluem: seletividade para os micro-organismos a eliminar; não ser corrosivo ao sistema; capacidade de manter o seu efeito inibidor em presença de outras substâncias no meio; apresentar propriedades de biodegradabilidade e, principalmente, ter custo baixo (Gaylarde *et al.*, 1999; Passman, 2000; Yemanshova *et al.*, 2007; Klinkson, 2009; Zimmer *et al.*, 2011).

Para garantir a eficácia do produto antimicrobiano, é necessário conhecer a população alvo a ser eliminada 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 da concentração ótima, assim como da natureza do componente ativo mais apropriado. 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 antimicrobianos.

O antimicrobiano selecionado para utilização em combustível, também necessita ter a sua efetividade testada, uma vez que os antimicrobianos podem sofrer degradação por fatores químicos e físicos, como temperatura, pH, ou efeitos biológicos como a atividade de enzimas e a adsorção celular em superfícies. Sem essas análises, o ambiente contaminado pode ser ineficientemente tratado.

No entanto, quando essa inativação não ocorre e, mesmo assim, o antimicrobiano não é efetivo na erradicação dos micro-organismos, devemos levar em consideração a possibilidade dos micro-organismos presentes no sistema apresentarem algum mecanismo de resistência às moléculas antimicrobianos (Gaylarde, 1995; Chapman, 2003; Russel, 2003).

Muitos estudos já foram realizados para visualizar a efetividade de antimicrobianos disponíveis para combustíveis no mercado. Bento & Gaylarde (1996) testaram quatro antimicrobianos solúveis em água e sua atividade em sistemas óleo/água contra bactérias e fungos isolados de tanques de armazenamento de diesel no Brasil. Uma mistura de isotiazolona e um

composto de amônio quaternário foram os dois mais efetivos em controlar a contaminação microbiana, os demais produtos, um glutaraldeído e um agente liberador de formaldeído foram ativos apenas em concentrações relativamente elevadas.

Bento & Gaylarde (2001) em uma avaliação em laboratório de diferentes concentrações do biocida isotiazolona (CMIT/MIT), observaram que 1 e 10 ppm de ingrediente ativo foram capazes de prevenir o crescimento de micro-organismos em meio Bushnell & Haas e óleo diesel, até 450 dias. Bücken (2010) avaliou o comportamento de isolados em meio caldo malte e na presença de antimicrobianos com as moléculas isotiazolona, oxazolidina, dioxiborinana e ditiocarbamato como princípio ativo. Eles observaram que as concentrações aplicadas dos antimicrobianos com isotiazolonas e oxazolidinas foram eficazes no controle do crescimento dos quatro micro-organismos testados (*Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces* sp., *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp.) em escala laboratorial.

Zimmer *et al.* (2011) avaliou uma mistura de duas isotiazolonas que testada em estocagem simulada em laboratório. Foram avaliados com diesel puro (B0), biodiesel puro (B100) e as misturas B7 e B10 como fase oleosa e meio mineral e água de lastro como fase aquosa. O mesmo apresentou alta efetividade no controle do crescimento microbiano, quando comparado a outro antimicrobiano contendo oxazolidinas.

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

antimicrobianos contendo oxazolidinas está relacionada principalmente a inibição da síntese de proteínas, pois essa molécula liga-se ao sítio P da subunidade maior do ribossomo, impedindo a formação do complexo de iniciação da tradução (Mukhtar & Wright, 2005; Devasahayam *et al.*, 2010).

Atualmente, os antimicrobianos em combustíveis ainda não são utilizados no Brasil. Porém algumas moléculas do grupo das isotiazolonas já são comercializadas em outros países com o propósito de controlar o crescimento microbiano (Bento & Gaylarde, 2001; Hill & Hill, 2009; Bento *et al.*, 2010).

O aumento da proporção de biodiesel adicionado ao diesel tende a aumentar a probabilidade de ocorrer problemas relacionados à biodeterioração do combustível (Pasqualino *et al.*, 2006; Bücken *et al.*, 2011). Esse cenário precisa ser levado em consideração no controle da contaminação microbiana utilizando antimicrobianos.

A necessidade do uso de um biocida ideal ou um aditivo multifuncional, o qual controle a população microbiana e tenha uma ampla faixa de atividade (contra fungos e bactérias aeróbias e anaeróbias) é imprescindível. De posse desse conhecimento, os problemas previstos pela literatura decorrentes do aumento do teor de biodiesel adicionado ao diesel, poderiam ser evitados (Bento & Gaylarde, 2001; Passman, 2003; Ambrozin *et al.*, 2009; Hill & Hill, 2009).

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1 Biodieseis**

#### **4.1.1 Produção**

Os biodieseis utilizados como a fase oleosa, nos experimentos, foram produzidos de acordo com Guzatto *et al.*, 2011, a partir de óleo de linhaça, óleo de soja e óleo de oliva, através de transesterificação metílica. A mesma foi conduzida através de duas catálises (uma inicial de caráter básica, com hidróxido de potássio (KOH), e posterior a essa, outra de caráter ácido, envolvendo ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Juntas é considerado que aumentam o rendimento da reação e diminuem a formação de sabões através desse processo, desenvolvido no CECOM - Centro de Combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes e Óleos, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

Após a produção, os biodieseis foram analisados através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (1H RMN), em um Espectrômetro da marca Bruker 400 MHz para conferir seu teor de ésteres (apresentado no Apêndice I).

Essas matérias primas contêm diferentes proporções de ácidos graxos, que apresentam diferentes números de insaturações, conforme ilustrado na figura 2, o que pode resultar em algumas diferenças nas características do combustível. Após a produção os biodieseis foram estocados em geladeira (4°C) até o momento da esterilização.

#### **4.1.2 Esterilização**

Os três biodieseis (linhaça, soja e oliva) foram esterilizados utilizando um sistema de filtração a vácuo, em frasco Kitassato e filtro, com membranas de porosidade de 0,22 µm (marca Milipore). Após a esterilização, foram armazenados em frascos de vidro previamente esterilizados em autoclave (121°C, 1 atm por 15 min) e cobertos por papel alumínio para evitar a foto-oxidação, separados conforme a matéria prima de procedência e armazenados em geladeira (4°C) por no máximo 7 dias antes de serem utilizados.

#### **4.2 Meio Mínimo Mineral**

Foram utilizados quatro tipos de meio mineral como fase aquosa nos experimentos e denominados, neste trabalho, de MM1 – Richard & Vogel (1999); MM2 – Tanner (1997); MM3 – Bushnell & Haas (1941); MM4 – Kaufmann & Kearney (1965), cujas formulações estão descritas no Anexo I. Estes meios possuem diferentes quantidades de fosfato, nutriente este que, juntamente com outros macronutrientes e micronutrientes presentes nesses meios, é considerado um limitante do crescimento microbiano. Além disso, o fosfato é um importante agente tamponante, efeito que é vantajoso para a manutenção da ação de certas enzimas. No entanto, possíveis mudanças no pH do sistema podem não ser detectadas devido à produção de metabólitos ácidos pelos micro-organismos em estudo. Esses podem não ser percebidos

durante o tempo de incubação, devido à capacidade tamponante do meio e provavelmente da concentração de ácidos.

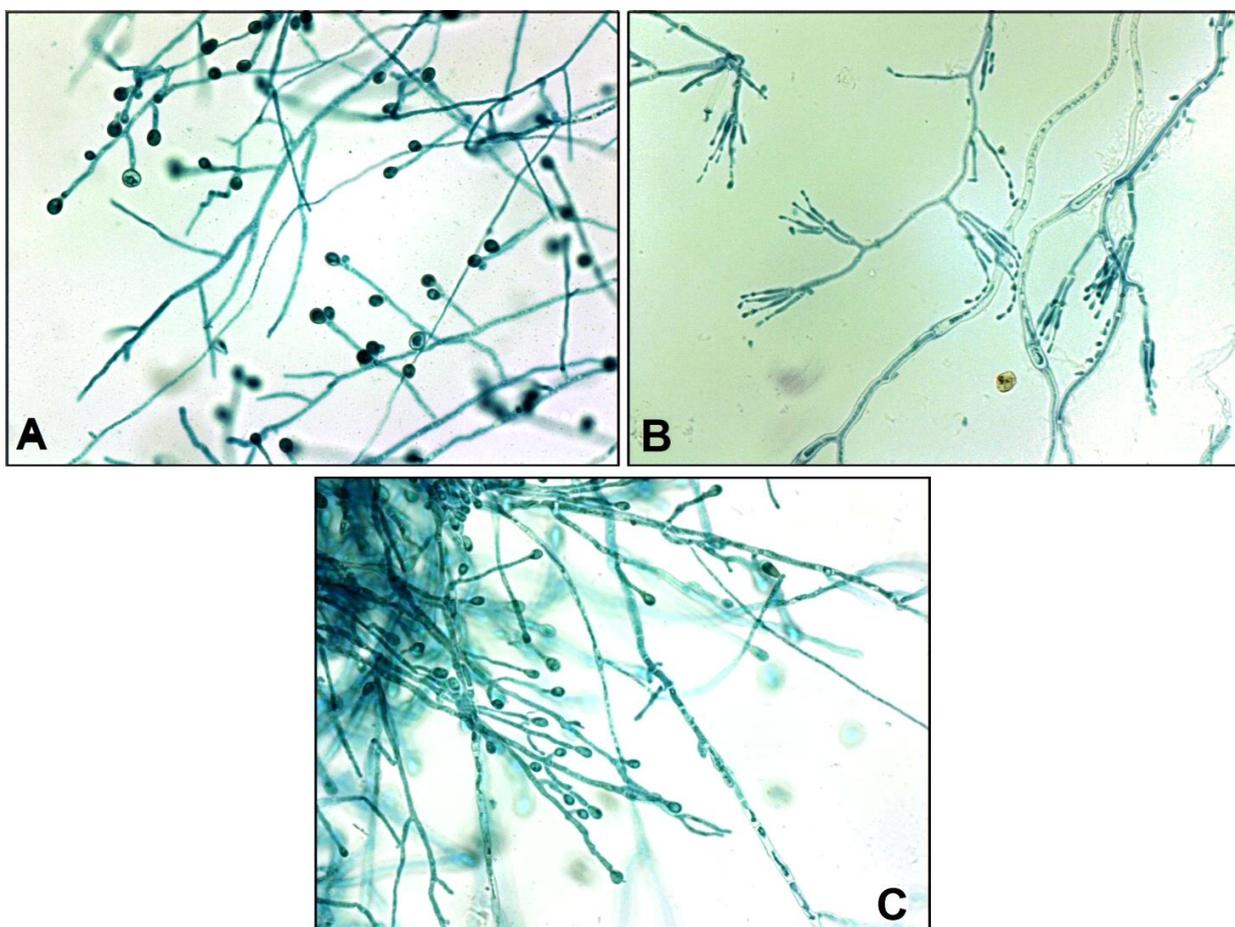
### 4.3 Micro-organismos

Foram utilizados os fungos *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium aurantiacum* e *Paecilomyces variotii* em todos os experimentos desse trabalho. Esses fungos fazem parte do Filo Ascomycota, o fungo *Paecilomyces variotii* é classificado na Família Trichocomaceae e os fungos *Pseudallescheria boydii* e *Scedosporium aurantiacum* na Família Microascaceae.

Na figura 5 estão apresentados fotos dos três fungos (*Paecilomyces variotii*, *Pseudallescheria boydii* e *Scedosporium aurantiacum*), preparadas pela técnica de microcultivo, onde é possível visualizar estruturas típicas dos esporos fúngicos, através de microfotografia tirada com o auxílio de um Microscópio Olympus CX31, com a câmera Digital Microscope Camera Mshot MD90, Aumento 400x.

O fungo *P. variotii* foi isolado de borra biológica, presente nos tanques de armazenamento de combustíveis (Bücker *et al.*, 2011). Os demais fungos foram isolados de solo proveniente de “landfarming”, uma técnica de biorremediação utilizada para tratar resíduos originários da indústria petrolífera (Schultz, 2010). Os fungos foram identificados através de amplificação da região ITS-5.8S-ITS2 pelos primers ITS-1 e ITS-4, e a seguir purificados e submetidos a sequenciamento automático no sistema Amersham MegaBACE 1000, usando os protocolos padronizados na Rede Genoma Brasileira.

O fungo *P. boydii* foi identificado pela Fundação André Tosello, e os fungos *S. aurantiacum* e *P. variotii* foram identificados no Centro de Biotecnologia, CBiot-UFRGS. Todos os isolados fúngicos foram mantidos em meio de cultura Ágar Malte (pH 5,4), e armazenados em geladeira (4°C), até o momento do experimento.



**Figura 5.** Microfotografia dos micélios e conidióforos dos fungos utilizados nesse trabalho. (A) *Pseudallescheria boydii*, (B) *Paecilomyces variotii*, (C) *Scedosporium aurantiacum*.

#### **4.4 Preparação do Inóculo**

Na preparação do inóculo os fungos foram semeados em tubos contendo ágar malte. Após sete dias de cultivo, foi adicionado água destilada estéril e 2 mL de um surfactante (Tween 80, preparado na concentração de 0,01%), para facilitar a remoção dos esporos. A solução obtida foi adicionada a 10 mL de meio mineral em erlenmeyers de 50 mL, e mantido em agitação a 120 rpm, a 30°C, por 24 horas, na tentativa de esgotar possíveis reservas nutritivas presentes nos esporos.

A concentração do inóculo foi determinada pela contagem dos esporos, presentes na solução, em Câmara de Neubauer. O inóculo foi preparado para cada fungo e em todos os experimentos foi utilizado uma alíquota com a concentração de  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.5 Fase Preliminar**

Uma fase preliminar foi realizada para selecionar as melhores condições para a curva de crescimento dos fungos filamentosos em biodiesel de linhaça, soja e oliva individualmente, utilizando os diferentes aportes minerais e as diferentes proporções de biodiesel para induzir o crescimento fúngico. Após observamos o melhor desempenho dos fungos nas diferentes preparações de fase oleosa e fase aquosa, o comportamento no o biodiesel e a fase aquosa foi analisada.

#### **4.5.1 Seleção de Fase Aquosa**

O objetivo deste experimento foi analisar a produção de biomassa na interface óleo-água e estabelecer diferenças entre o crescimento fúngico de acordo com o aporte mineral recebido. Foram avaliados, durante 28 dias, o crescimento dos três isolados fúngicos nos quatro meios, denominados MM1 – Richard & Vogel (1999); MM2 – Tanner (1997); MM3 – Bushnell & Haas (1941); MM4 – Kaufmann & Kearney (1965) (formulações em anexo I).

Os microcosmos foram preparados em frascos de vidro com capacidade para 20 mL, onde 10 mL foi composto pelo meio mineral (fase aquosa) e 6 mL por biodiesel de soja (fase oleosa).

Essa proporção foi resultante do processo de seleção do item 4.5.1. Os experimentos foram executados na presença e na ausência de cada fungo (controle negativo).

Cada experimento foi montado com triplicata para cada tratamento. Com repetições destrutivas. A cada sete dias foram avaliados medidas de pH, a formação de biomassa e a concentração de fosfato na fase aquosa por cada tratamento, conforme descrito pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – 19<sup>th</sup> edition, 1995. A partir destes resultados, foi eleito o meio mineral que promoveu melhores condições para o crescimento dos fungos.

#### **4.5.2 Seleção do volume da Fase Oleosa**

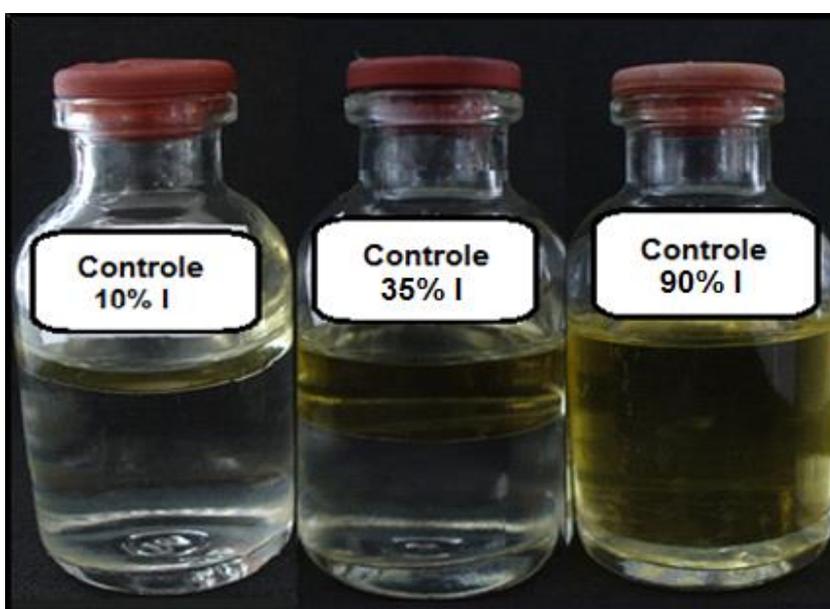
Nesta etapa, após a eleição do meio mineral, foi avaliada a influência do volume da fase oleosa com relação ao crescimento fúngico. Foi

montado um microcosmo em frascos com capacidade para 20 mL e foram avaliadas as proporções de fase óleo e meio mínimo mineral Bushnell & Haas (Figura 6):

2 : 18 - 10% biodiesel: 90% meio de cultura (2 mL/18 mL)

7 : 13 - 35% biodiesel: 65% meio de cultura (7 mL/13 mL)

18 : 2 - 90% biodiesel: 10% meio de cultura (18 mL/2 mL)



**Figura 6.** Aspecto dos frascos com as diferentes porcentagens de fase oleosa avaliadas, representando os frascos controle, usados para o experimento.

Essas proporções foram montadas levando em consideração uma condição real de estocagem, em que  $\pm 1\%$  de fase aquosa está presente em 99% de combustível. A partir disso, foi proposto um extremo (10% de combustível) e uma condição intermediária, para conferir o efeito do tamanho da coluna de óleo na formação de biomassa. Uma alíquota dos inóculos dos fungos, preparados como descrito anteriormente ( $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>), foi

adicionada aos frascos e, após 28 dias, foram analisadas as biomassas fúngicas formadas na interface óleo-água.

#### **4.5.3 Interações Fase Oleosa x Fase Aquosa**

Para detectar a migração de componentes do biodiesel para a fase aquosa, foram monitorados na fase aquosa: concentração de fosfato do meio mineral em contato com o biodiesel, valores de pH do meio mineral selecionado e avaliação da fase aquosa por cromatografia gasosa com detector de massas (CGMS).

O experimento foi montado com a proporção de 35%, em frascos de vidro contendo 5 mL de biodiesel de linhaça, soja e oliva, individualmente, e 9 mL de meio mineral ou água ultrapura (MiliQ- System Millipore, Bedford, MA), esta última, utilizada como controle. A água ultrapura é conhecida principalmente pela ausência de íons. O experimento foi avaliado durante 120 dias, com análises realizadas aos 0, 7, 14, 21, 28, 42, 60 e 120 dias.

##### **4.5.3.1 Concentração de Fosfato**

A concentração de fosfato foi determinada pelo método do ácido ascórbico, conforme descrito em Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – 19<sup>th</sup> Edition, 1995. Esse método consiste na reação do molibdato de amônio e do antimonil tartarato de potássio com o ortofosfato, formando o ácido fosfomolibdico.

Esse composto é reduzido pela ação do ácido ascórbico formando uma solução de cor azul intensa diretamente proporcional à concentração do

fósforo presente na amostra, a qual é medida utilizando a espectrofotometria de absorção molecular. Uma curva padrão foi montada a partir de uma solução com 50 mg P-PO<sub>4</sub><sup>-2</sup>.L<sup>-1</sup>, com 8 pontos de absorbâncias e cujas concentrações foram 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 1,0 – 2,0 – 4,0 – 8,0 mg P-PO<sub>4</sub><sup>-2</sup>.L<sup>-1</sup>. A partir disso do gráfico formado e com a equação da reta gerada, foi determinada a concentração de fosfato em cada amostra (Apêndice II).

#### **4.5.3.2 Medidas de pH**

As medidas dos valores de pH foram realizados durante todos os tempos amostrais, na fase aquosa retirada dos microcosmos, à temperatura ambiente, com o auxílio de um pHmetro digital da Digimed, modelo DM-22A.

#### **4.5.3.3 Cromatografia Gasosa com Detector de Massas (CGMS)**

Aos sete dias de cultivo foram coletados 10 mL de meio mineral. O mesmo foi submetido à extração líquido-líquido (processo de separação que realiza a extração de uma substância de uma fase líquida em outra fase líquida), com o solvente diclorometano (DCM), nas proporções de 10mL de meio mineral para 60 mL de DCM, em um funil de separação, por três vezes.

Os extratos de DCM contendo os ésteres foram combinados e secos com a adição de sulfato de sódio para absorver possíveis quantidades de água residual proveniente do meio mineral. Após, o extrato livre de água, foi transferido para um balão de rotaevaporador (Marca IKA) e concentrado um volume de aproximadamente 1 mL.

Os extratos concentrados foram analisados por cromatografia a gás – equipamento da Agilent - (modelo 6890) com detector de massas (modelo 5973), operando no modo Scan (45-550 u.m.a.) e equipado com coluna DB-5 da J&W, de 60 mx0,25 mmx0,25 µm, nas seguintes condições de análise: injeção de 1µL no modo Split (1:100),  $T_{inicial}=100^{\circ}\text{C}$  por 1 min, seguido de aquecimento de  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $260^{\circ}\text{C}$  e isoterma por 1 min, com o fluxo de gás carreador (He) de 1 ml/min.

#### **4.6 Fase de avaliação**

Após a seleção do meio mínimo mineral e da porcentagem de biodiesel pela fase preliminar, foram conduzidas as curvas de crescimento dos três fungos analisados (*P. boydii*, *S. aurantiacum* e *P. variotii*) nos três biodieseis (linhaça, soja e oliva), previstas para a fase de avaliação, para verificar o papel deteriogênico de biodiesel dos fungos filamentosos em questão.

##### **4.6.1 Curva de crescimento dos fungos filamentosos em biodieseis de linhaça, soja e oliva**

Os experimentos envolvendo o crescimento dos fungos filamentosos utilizando os biodieseis, descritos anteriormente, como fonte de carbono e energia, foram realizados em frascos de vidro com capacidade para 100 mL. A fase aquosa foi constituída pelo meio mínimo mineral, selecionado na fase preliminar do estudo (Sessão 4.5.1).

Em cada frasco de vidro foram adicionados 30 mL do meio mineral, devidamente identificados e após a esterilização, adicionou-se a fase oleosa (15 mL) assepticamente, correspondendo a 35% de biodiesel adicionado ao meio mineral. A fase oleosa foi constituída pelos biodieseis produzidos a partir dos óleos de linhaça, de soja e de oliva, como descrito na sessão 4.1. Os frascos foram recobertos com papel alumínio para evitar a foto - oxidação do combustível. O experimento foi realizado em triplicata, montado com repetições destrutivas.

O inóculo foi preparado conforme descrito no item 4.4. Após as 24 horas de agitação, foi utilizado uma alíquota da solução de esporos (inóculo) em cada frasco do cultivo do experimento (correspondente para cada fungo), com concentração de  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Os frascos foram incubados em estufa, a 30°C, sem agitação.

#### **4.6.2 Análises Conduzidas**

Foram realizadas várias análises nos tempos estipulados: 0, 7, 14, 21, 28, 42, 60 e 120 dias. Em cada tempo separou-se as fases oleosa, aquosa e a biomassa proveniente do crescimento do fungo em funil de separação de vidro com capacidade para 500 mL.

Da fase oleosa amostrou-se uma alíquota, a qual foi armazenada em frascos estéreis com capacidade para 1,8 mL. A fase oleosa dos ensaios nos tempos 60 e 120 dias foi avaliada para verificar a degradação dos ésteres presentes no biodiesel, através da técnica de Cromatografia Gasosa (CG) pelo método NBR 15764.

A fase aquosa foi armazenada em frascos de plásticos estéreis com capacidade para 15 mL, de onde foram retiradas as amostras para as análises. Avaliou-se a presença de metabólitos produzidos pelo fungo, através da medida do pH, de produção de substâncias surfactantes e o consumo de fosfato.

Para a quantificação do crescimento fúngico, foi realizado inicialmente a separação da biomassa formada na interface óleo-água com o auxílio de um sistema de filtração a vácuo. A biomassa fúngica foi quantificada por pesagem, a ser descrito a seguir.

#### **4.6.2.1 Interface Água/Óleo – Quantificação da biomassa**

Após a separação das fases aquosa e oleosa de cada frasco com um funil de separação, a biomassa formada na interface foi avaliada através da pesagem, onde ela foi filtrada, em um sistema a vácuo, em discos de papel filtro (Marca J.Prolab, gramatura 80, espessura 205  $\mu\text{m}$ , porosidade 14  $\mu\text{m}$ ). Os discos foram numerados e submetidos previamente a um processo de remoção de umidade do disco, sendo mantidos em estufa a 50°C por 24h e após colocado em um dessecador.

Posteriormente foram pesados em uma balança de precisão. Após a retenção da biomassa no filtro foi adicionado 3 mL de hexano para a remoção do excesso de óleo aderido, sobre cada disco. Os discos, contendo a biomassa, foram colocados em estufa a 30°C, durante 4 dias para secagem. Após esse período, foram pesados em uma balança de precisão (Marca Marte

– modelo AL200C). Para o cálculo da biomassa produzida os valores iniciais foram subtraídos dos pesos finais das membranas.

#### **4.6.2.2 Fase aquosa**

A fase aquosa do experimento de curva de crescimento foi avaliada quanto à presença de substâncias tensoativas e de metabólitos com características ácidas ou básicas. Estas variáveis foram monitoradas durante todo o experimento, nos tempos estabelecidos da curva de crescimento.

##### **4.6.2.2.1 Determinação da Concentração de fosfato na fase aquosa**

A determinação de fosfato foi realizada visando monitorar o consumo deste nutriente pelos fungos durante o crescimento. A determinação da concentração de fosfato na fase aquosa da curva de crescimento foi realizada pelo método descrito em Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – 19<sup>th</sup> Edition, (1995) (item 4.5.3) e foi realizado em todos os tempos analisados.

##### **4.6.2.2.2 Medida de Tensão superficial**

As medidas de tensão superficial foram realizadas em um medidor de tensão superficial digital (Gibertini, Milão, Itália), utilizando-se o método da placa de Wilhelmy (Luz & Lima, 2007). As amostras da fase aquosa do experimento foram retiradas da geladeira, onde ficaram armazenadas por no máximo 24h desde a sua coleta, permaneceram por 30 min em temperatura

ambiente e a medida de tensão superficial foi então determinada. Para a medida foram utilizados cerca de 10 mL de fase aquosa. Para a calibração do aparelho utilizou-se como padrões líquidos a água destilada (72,0 mN.m<sup>-1</sup>) e etanol (24,0 mNm<sup>-1</sup>) (Giancoli, 2005).

#### **4.6.2.2.3 Detecção da produção de metabólitos ácidos**

As medidas de pH foram conduzidas em todos os tempos experimentais definidos na seção 4.6.1, e conforme o procedimento descrito na seção 4.5.3.2.

#### **4.6.2.2.4 Detecção da produção de Lipase**

A determinação da atividade de lipase foi realizada conforme metodologia proposta por Winkler & Stuckmann (1979). Utilizou-se 100µL de amostra e colocou-se para reagir com 900µL da solução com p-nitrofenilpalmitato (p-NPP, massa molecular = 377,5g/Mol, substrato para a enzima). Após 30min procede-se a leitura em espectrofotometria, a 410nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a produção de 1µmol de p-nitrofenol, de coloração amarela, por minuto nas condições estabelecidas (pH 8,0, 37°C, 30 min).

Para a quantificação da enzima nas amostras, foi montado uma curva padrão utilizando o p-nitrofenol e obtida a equação da reta do gráfico, de onde se pode determinar a quantidade de p-nitrofenol liberado durante a reação com a amostra. A análise foi conduzida em todos os tempos experimentais.

#### **4.6.2.3 Fase oleosa**

Após a separação das fases, a fase oleosa de cada biodiesel testado foi avaliada quanto à degradação das cadeias de ésteres de ácidos graxos pela ação dos micro-organismos, a partir das amostras dos três biodieseis (B100), utilizando a técnica de cromatografia gasosa (CG) segundo a metodologia descrita na NBR 15764.

##### **4.6.2.3.1 Cromatografia Gasosa**

O cromatógrafo utilizado para as análises foi um Shimadzu 2010 com injetor tipo on-column e detector de ionização de chama (FID), equipado com uma coluna para altas temperaturas, SGE - HT5 (25m x 0,32 mm x 0,1µm). A determinação total do teor de Ésteres em Biodiesel foi determinada segundo a NBR 15764. As condições de análise do aparelho foram:  $T_{\text{injetor}}$  e  $T_{\text{detector}} = 380^{\circ}\text{C}$ , forno com  $T_{\text{inicial}} = 50^{\circ}\text{C}$ , por 1 min, seguido de aquecimento de  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $180^{\circ}\text{C}$ , seguido das taxas de  $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $230^{\circ}\text{C}$ , e de  $20^{\circ}\text{C}$  até  $380^{\circ}\text{C}$ , mantendo por 10 min. O padrão interno utilizado foi o heptadecanoato de metila. A quantidade de amostra injetada foi de  $0,5\mu\text{l}$  e o gás de arraste He.

## **4.7 Controles do Crescimento Fúngico utilizando Antimicrobianos**

### **4.7.1 Antimicrobianos**

Foram utilizados quatro produtos antimicrobianos nesse trabalho, sendo denominados MBO, MBO 8%, MBO 50% e NBM. Os antimicrobianos MBO 8% e MBO 50% são considerados aditivos multifuncionais e possuem um coeficiente de partição que os permite ser solúveis em óleo e insolúveis ou poucos solúveis em água (Siegert, 2009). A fração biocida corresponde a uma mistura de oxazolidinas em 8 e 50%, respectivamente.

O produto denominado MBO contém a molécula 3,3'-Methylenebis[5-methyloxazolidine] como princípio ativo. Também é solúvel tanto em óleo quanto em água, e é considerado de fácil biodegradação, desde que suficientemente diluído (Siegert, 2009).

O produto denominado NBM está registrado na Agência Ambiental Americana como sendo um antimicrobiano e um aditivo de uso em combustíveis com a molécula 4-(2-nitrobutyl)morpholyne e 4,4'-(2ethyl-2-nitrotrimethylene)-dimorpholine como princípio ativo e é solúvel tanto em água quanto em óleo.

Os antimicrobianos MBO, MBO 8%, MBO 50% e NBM, citados acima pertencem à classe de produtos designados tradicionalmente por serem potenciais liberadores de formaldeído, um agente alquilante que age sobre todos os tipos de micro-organismos (Groot *et al.*, 2010).

Seu mecanismo de ação envolve a alquilação entre a aldoxila do formaldeído e os átomos de hidrogênio lábeis dos radicais amino (-NH<sub>2</sub>),

hidroxila (-OH) e carboxila (-COOH) de proteínas e ácidos nucleicos, impedindo que esses elementos celulares executem suas funções (Rutala & Weber, 2008; Barbosa & Sartori, 2012).

#### **4.7.2 Concentração Inibitória Mínima (CMI) e Concentração Mínima Biocida (CMB)**

A CMI e a CMB são uma avaliação orientativa e são obtidas em condições ótimas de cultivo e informam sobre possíveis faixas de concentração que inibem e matam os micro-organismos.

A CMI é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo (ação estática) nos teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo. A concentração mínima biocida (CMB) é definida como a menor concentração de um agente microbiano capaz de causar a morte dos micro-organismos selecionados (ação “cida”) (ANVISA, 2002; Acosta-Díaz *et al.*, 2011).

A determinação da CMI do antimicrobiano foi realizada através do método de diluição em caldo, onde uma solução estoque dos antimicrobianos foi preparada na concentração inicial de 4 g/L, com base nas informações de percentual de ativo no produto. Em frascos esterilizados, com capacidade para 15 mL, adicionou-se 5mL de caldo malte e 5mL da solução estoque.

Este primeiro frasco apresentou uma concentração de 2 g/L do antimicrobiano. A partir desse, foram realizadas diluições sucessivas em caldo malte, obtendo-se as concentrações de 2 g/L; 1 g/L; 0,5 g/L; 0,25 g/L; 0,125 g/L; 0,064 g/L; 0,032 g/L; 0,016 g/L; 0,008 g/L; 0,004 g/L; 0,002 g/L. Um frasco,

contendo apenas caldo malte e o inóculo do fungo, constituiu o controle do teste. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A concentração dos inóculos foram as mesmas utilizadas no item 4.4. Os fungos foram avaliados às 24h, 48h, 5 dias, 7 dias, 10 dias e 15 dias de cultivo. A determinação da CMI foi realizada através da visualização da ausência de crescimento dos micro-organismos nas diferentes concentrações do antimicrobiano testadas nos frascos. Após determinar a CMI de cada antimicrobiano sobre os micro-organismos, também foram avaliadas a concentração mínima biocida dos produtos.

A partir da concentração em que houve inibição do crescimento, foi inoculado o meio de cultura, das amostras sem crescimento, em ágar malte. A concentração mínima biocida (CMB) foi determinada através da ausência absoluta de crescimento dos micro-organismos nas diferentes concentrações do antimicrobiano testadas, indicando também uma ação esporicida.

#### **4.8 Análise Estatística**

A análise estatística dos dados de crescimento, pH, fosfato e lipase, obtidos durante o estudo foi realizada com o uso do programa Statistica 7.1. Foi realizado a análise de variância e o teste de Tukey ao nível de 5% de significância, para verificar diferenças entre os diferentes tratamentos, nos tempos avaliados.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Fase Preliminar

#### 5.1.1 Seleção da Fase Aquosa (Meio Mínimo Mineral)

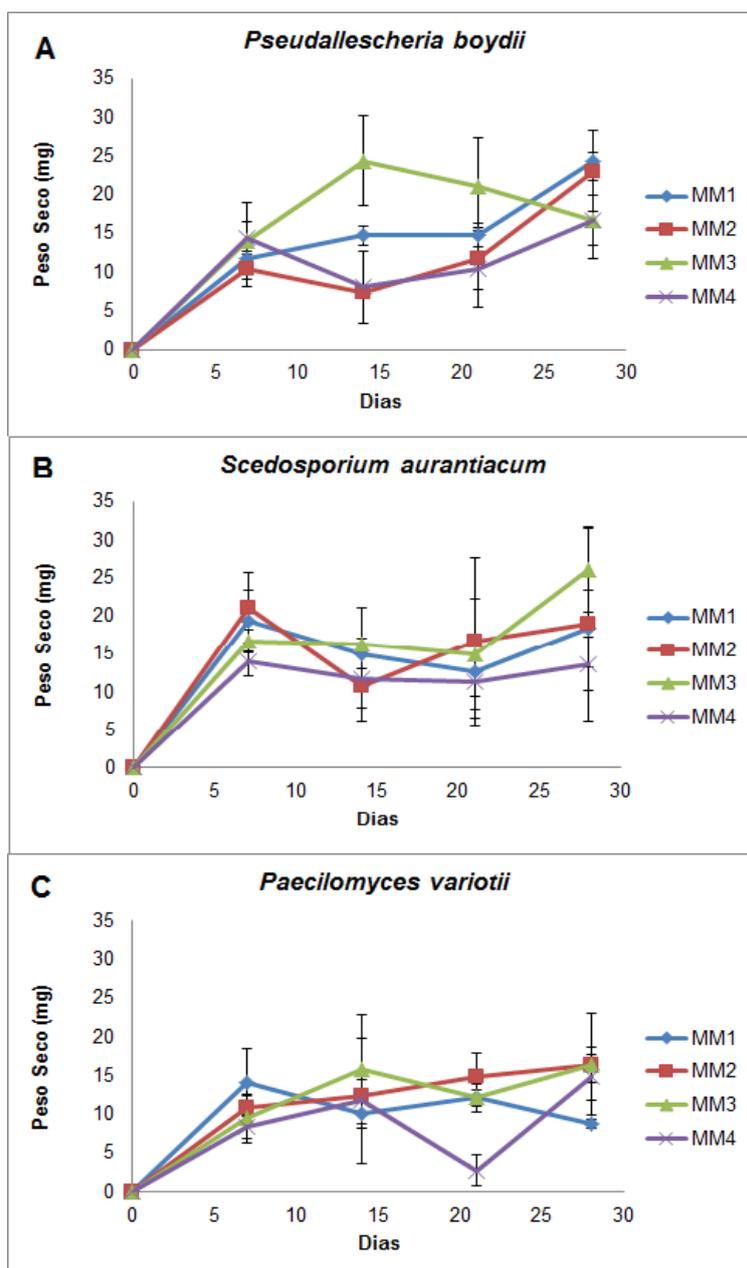
O primeiro biodiesel sintetizado pelo CECOM, disponível para os ensaios, foi o biodiesel de soja, por esta razão essa matéria prima foi a utilizada como fase oleosa na fase preliminar. A soja é, atualmente, a matéria prima responsável por 80% de todo biodiesel usado no Brasil, seguida pelo gordura animal (13%) e óleo de algodão (3%) (Suarez et al, 2009; ANP, 2012).

Na avaliação do crescimento de *P. boydii*, *S. auratiacum* e *P. variotii* em quatro meios mínimos minerais (fase aquosa) e biodiesel de soja como fase oleosa verificou-se que todos os meios mínimos analisados, bem como a fonte de carbono utilizada (biodiesel de soja), favoreceram o crescimento dos fungos, conforme a Figura 7.

Os valores individuais de crescimento por tempo analisado não diferiram estatisticamente entre os meios minerais analisados ( $p > 0,05$ ). Apenas os valores totais da biomassa formada demonstraram diferenças entre os meios de cultura para todos os fungos. Os maiores valores de biomassa foram observados no meio mineral MM3 – Bushnell & Hass. para os fungos: *Pseudallescheria boydii* (76mg), *Scedosporium aurantiacum* (74mg) e *Paecilomyces variotii* (53,3mg).

O meio com menor suporte mineral (MM4 – Kaufmann & Kearney) apresentou o menor crescimento geral detectado (37,3 mg) com o fungo *P. variotii* ( $p < 0,05$ ). Foi observado pelos valores de biomassas totais obtidos para

todos os fungos, que o meio MM3 promoveu a melhor condição de nutrientes minerais.



**Figura 7.** Curva de crescimento dos Fungos Filamentosos em Biodiesel de Soja (Valores referentes a cada tempo analisado). (A) *Pseudallescheria boydii*; (B) *Scedosporium aurantiacum*; (C) *Paecilomyces variotii*. (MM1 – Richard & Vogel, MM2 – Tanner, MM3 – Bushnell & Haas, MM4 – Kaufmann & Kearney).

Em nosso trabalho, no tempo final de incubação (28 dias), observamos, nas médias obtidas, que os meios mínimos minerais que favoreceram o crescimento do isolado *Pseudallescheria boydii* foram o meio MM1 (Richard & Vogel) e MM2 (Tanner).

O meio MM3 (Bushnell & Haas) ao final dos 28 dias, promoveu valores de biomassa aproximadas para o isolado *P. boydii* aos 14 dias (24mg), observados nos meios MM1 e MM2 ao final dos 28 dias (24 e 23mg, respectivamente), sugerindo uma aceleração no crescimento por parte do meio MM3.

Dentre os meios mínimos testados nesse trabalho, o que mais beneficiou o crescimento do isolado *S. aurantiacum* foi o meio MM3: ao final de 28 dias a formação de biomassa desse meio foi maior (26mg) quando comparada com os demais meios. O isolado apresentou a menor formação de biomassa aos 28 dias no meio mineral MM4, o qual possui menos nutrientes que os demais meios, evidenciando a importância desses elementos no crescimento fúngico.

Os menores valores de biomassa foram observados para o isolado *Paecilomyces variotii* quando comparados aos outros isolados. Ao final dos 28 dias de análise, esse isolado apresentou a maior formação de biomassa igual nos meios MM2 e MM3 (16mg). Como podemos observar na figura 7, o menor crescimento ao final do período de incubação foi constatado no meio mineral MM1 (Richard & Vogel) (8mg).

A capacidade de crescimento do isolado *P. boydii* em biodiesel já havia sido avaliada por Janda-Ulfig *et al.* (2008), com diesel, biodiesel e óleo de

colza, e puderam observar que o biodiesel, ao contrário do diesel, induziu o crescimento dos isolados analisados. Em nosso trabalho podemos constatar a capacidade de crescimento desse fungo também em biodiesel de soja.

Cazarolli *et al.* (2012) avaliou o crescimento de *P. boydii* no meio mínimo mineral MM1 – Richard & Vogel e em biodiesel de sebo bovino durante 60 dias. Ao final dos 60 dias pode-se observar a formação de 930mg de biomassa por esse isolado. Neste trabalho, no entanto, ao final dos 30 dias de cultivo, observamos que o meio MM3 induziu mais rapidamente o crescimento do isolado quando comparado ao MM1. O fungo *Pseudallescheria boydii*, apresentou valores de biomassa aos 14 dias de análise, iguais ao meio MM1 aos 28 dias (24mg), sugerindo melhor aporte mineral do MM3.

Claubien & Schmidt (1998) observaram o crescimento do fungo *Scedosporium apiospermium* em p-cresol, utilizando o meio mínimo Barnett & Ingrain (1955) como suporte mineral. Ao final de 10 dias de incubação observou-se a formação de mais de 300 mg/L de biomassa. Em nosso estudo, o meio Bushnell & Haas (MM3) demonstrou possuir o aporte mineral capaz de impulsionar o crescimento do nosso isolado *S. aurantiacum*, sendo nesse meio que, ao final de 28 dias, a formação de biomassa foi maior (53,3mg) quando comparada com os demais meios.

O isolado *Paecilomyces variotii* desenvolveu-se usando o biodiesel de soja como fonte de carbono, bem como o aporte mineral de todos os meios foram suficientes para induzir a formação de biomassa por esse isolado, concordando com estudos prévios, os quais identificam a capacidade desse fungo de crescer em substratos de difícil degradação. Wang *et al.* (2010) testou

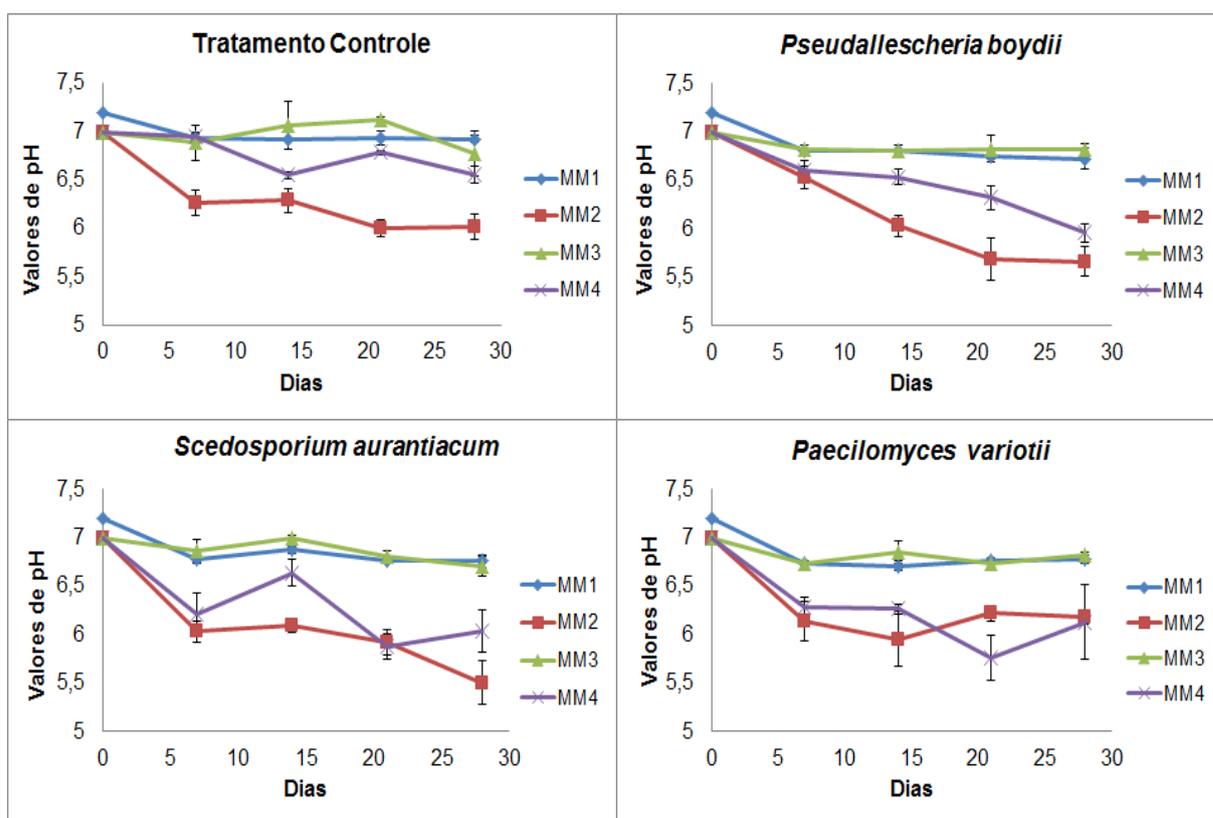
a capacidade deteriorogênica do isolado *Paecilomyces variotii* JH6 usando fenol como fonte de carbono e meio mínimo mineral como suporte nutricional para o crescimento. O isolado foi capaz de metabolizar ativamente o composto em temperaturas de 30 a 45°C, e valores de pH de 3 a 7.

### **5.1.2 Valores de pH dos Meios Mínimos Minerais**

Durante a degradação microbiana de hidrocarbonetos presentes em combustíveis, são produzidos diversos compostos orgânicos, entre eles ácidos orgânicos (Bento *et al.*, 2005). O meio Richard & Vogel (MM1) manteve o pH com menos alterações ao longo do tempo em todos os tratamentos com fungo. Este meio contém a maior quantidade de fosfatos/L (3,39 g/L) em comparação aos demais meios minerais (Figura 8).

Os valores de pH monitorados no meio MM4 indicaram variações mais acentuadas nos tempos analisados. A razão para estes resultados provavelmente deve-se ao fato de que esse é o único dos quatro meios analisados que não possui fosfato em sua formulação, e a presença desse composto nessas análises pode ser explicada pela ocorrência de pequenas quantidades de fosfato no biodiesel, as quais podem misturar-se ao meio mínimo mineral.

Bento (2001) testou o efeito de tamponamento do meio mineral MM3 – Bushnell & Haas 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 1mL de HCl (0,1 N) em 50 ml de meio Bushnell & Haas.



**Figura 8.** Valores de pH da fase aquosa com diferentes composições minerais durante a curva de crescimento dos fungos com óleo de soja como fase oleosa.

Estas constatações informam que a presença de fosfatos podem mascarar a presença de ácidos orgânicos, que são produzidos pelo fungo. Neste sentido, os meios minerais MM1 e MM3, devido às concentrações de fosfato, provavelmente podem ter mascarado a produção de metabólitos ácidos pelos fungos.

Os valores de pH, em nosso experimento, variaram ao longo do tempo, o que pode nos indicar uma produção de metabólitos com caráter ácido devido ao metabolismo dos fungos analisados no estudo. Ao final do estudo o meio em que foi observado uma redução mais acentuada do pH em 3 dos tratamentos (controle – 6,0, *P. boydii* – 5,6, e *S. aurantiacum* – 5,5) foi o meio

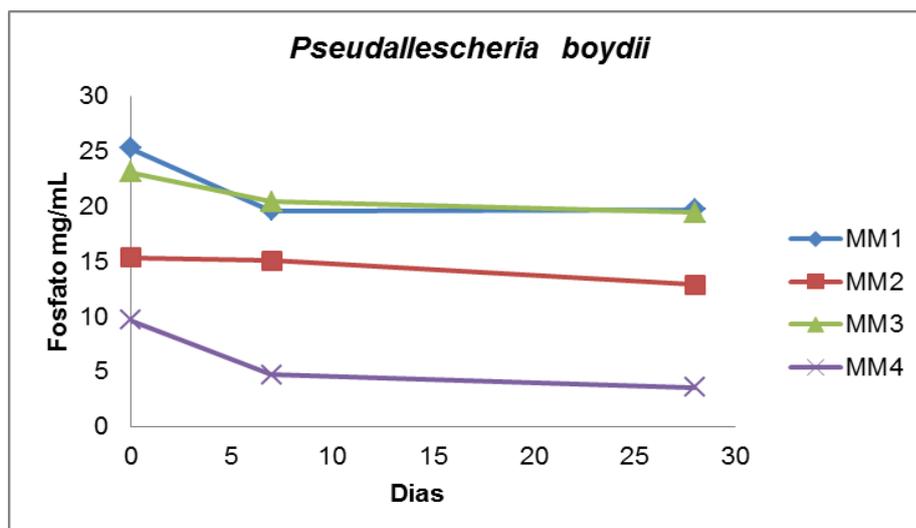
MM2 ( $p < 0,05$ ) (0,069g/L de fosfato), com exceção do fungo *P. variotii*, para o qual os meios MM2 e MM4 permaneceram semelhantes (pH 6,1 para ambos) ao final dos 28 dias de análise ( $p > 0,05$ ) (Figura 8).

### **5.1.3 Monitoramento da Concentração de Fosfatos nos Meios Mínimos Minerais**

A determinação da quantidade de fosfato nos meios minerais e biodiesel de soja, durante as curvas de crescimento, está apresentada nas figuras 9, 10, 11 e 12. Os experimentos foram conduzidos em biodiesel de soja por ser desta matéria prima a maioria do biodiesel usado no Brasil e as análises foram realizadas aos tempos 7 e 28 dias.

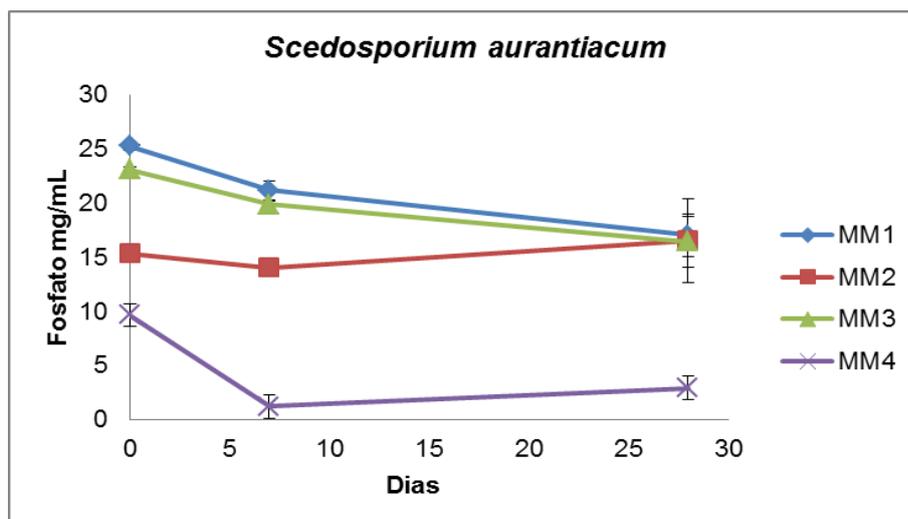
O fosfato é considerado um nutriente essencial ao desenvolvimento microbiano, pois participa da estrutura de diversos constituintes celulares, incluindo moléculas importantes, como ATP e fosfolipídeos (Kavanagh, 2011). Segundo Moore (1996), as concentrações de fósforo entre 0,001 M e 0,004 M são necessárias para manter o crescimento normal de qualquer fungo.

Desta forma, é de se esperar que ocorra o consumo dos íons fosfato presentes nos meios de cultura durante o desenvolvimento da biomassa fúngica. Nossos resultados mostraram que o crescimento fúngico dependeu do aporte de fosfato, dados confirmados pela produção menor de biomassa que os fungos *P. boydii*, *S. aurantiacum* e *P. variotii* apresentaram no MM4 (49,33mg, 50,67mg e 37,33mg, respectivamente), meio não possuía fosfatos em sua formulação, em relação à biomassa detectada nos outros meios.

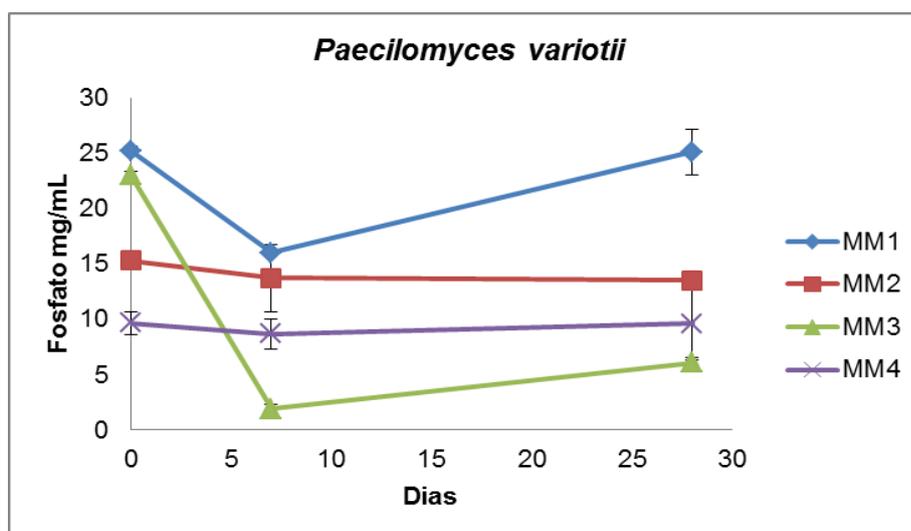


**Figura 9.** Valores de fosfato (mg/mL) presentes nos meios minerais durante a curva de crescimento do fungo *P. boydii* com óleo de soja como fase oleosa.

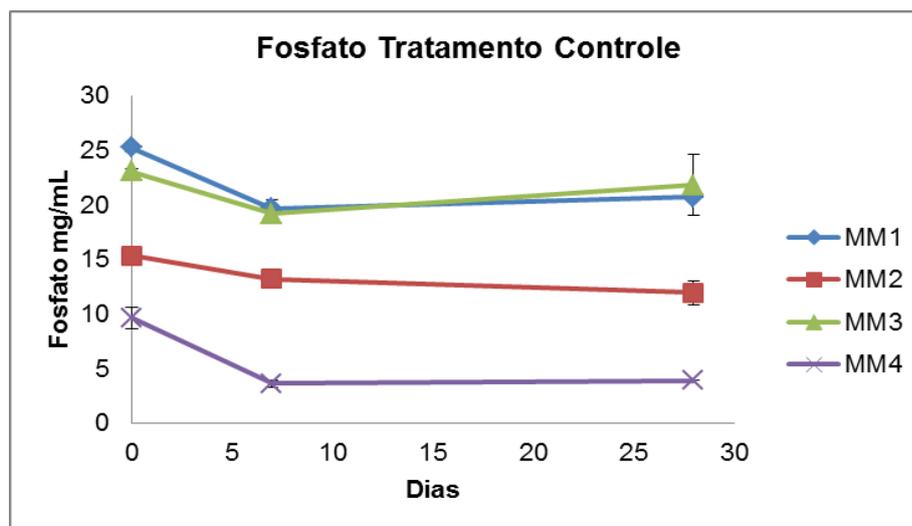
Bento *et al.* 2005 avaliou a concentração de fosfato em meio mínimo mineral e diesel metropolitano como fonte de carbono, e após 60 dias detectou redução na concentração de fosfato, indicando o consumo desse nutriente ao longo do tempo, pelos fungos *Aspergillus fumigatus*, *Hormoconis resinae*, *Candida silvicola* e pelo consórcio dos três micro-organismos. No entanto, ao final do nosso estudo, foi observado que a concentração de fosfato apresentou um aumento em alguns tratamentos.



**Figura 10.** Valores de fosfato (mg/mL) presentes nos meios minerais durante a curva de crescimento do fungo *S. aurantiacum* com óleo de soja como fase oleosa.



**Figura 11.** Valores de fosfato (mg/mL) presentes nos meios minerais durante a curva de crescimento do fungo *P. variotii* com óleo de soja como fase oleosa



**Figura 12.** Valores de fosfato (mg/mL) do tratamento controle presentes nos meios minerais durante a curva de crescimento com óleo de soja como fase oleosa.

Este fato pode estar associado ao combustível utilizado nos estudos. O biodiesel apresenta em sua composição fosfatídeos (Suarez *et al.*, 2009) e, devido a processos de degradação (biótica ou abiótica) da fração combustível, moléculas fosfatadas também podem ter sido liberadas para a fase aquosa.

Ao final da curva de crescimento, pode ser observada de modo geral, nas figuras 9, 10 e 11, uma redução na concentração de fosfatos (28 dias) nos meios MM1 e MM3, evidenciando um consumo desse composto pelos micro-organismos analisados.

Considerando os resultados obtidos na etapa de seleção dos meios minerais, o meio MM3 – Bushnell & Haas (1,23 g/L de fosfatos) foi o escolhido, dentre os meios mínimos analisados, para os ensaios posteriores com os fungos filamentosos. O suporte mineral presente por ele induziu a maior

formação de biomassa fúngica entre os isolados, e, ao final de 28 dias de incubação, foi evidenciado o consumo de fosfato presente no meio por esses micro-organismos.

#### **5.1.4 Seleção do volume da Fase Oleosa.**

Além dos fatores temperatura e pH do meio influenciarem no crescimento fúngico, precisa estar disponível o oxigênio para que o fungo possa metabolizar o carbono presente no biodiesel (Kavanagh, 2011). Em um sistema de microcosmo, em que o fungo está localizado na interface óleo/água, como o utilizado nesse trabalho, o oxigênio torna-se limitante ao longo do tempo. A difusão do oxigênio pode ficar prejudicada, especialmente se o volume de óleo for grande. A concentração de oxigênio dissolvido na fase aquosa (0,008 g/L) pode limitar o crescimento ao longo do tempo.

Nesse experimento foi avaliada a influência da proporção da fase oleosa em relação à fase aquosa para determinar a quantidade de biodiesel adequada que permita o crescimento microbiano e a formação de biomassa pelos fungos. Os resultados de biomassa obtidos nas diferentes condições, com relação às porcentagens de fase oleosa não permitiram observar variação significativa entre os tratamentos, com exceção para o fungo *Paecilomyces variotii* na proporção de 35% de óleo ( $p < 0,05$ ) (Figura 13).

Para o fungo *Pseudallescheria boydii* a diferença observada ( $p < 0,05$ ) foi no tratamento com 90% de óleo, sendo esse o que apresentou menor formação de biomassa, ou seja, a difusão de oxigênio e disponibilidade

de nutrientes para esse tratamento não foram suficientes para induzir o crescimento do isolado.

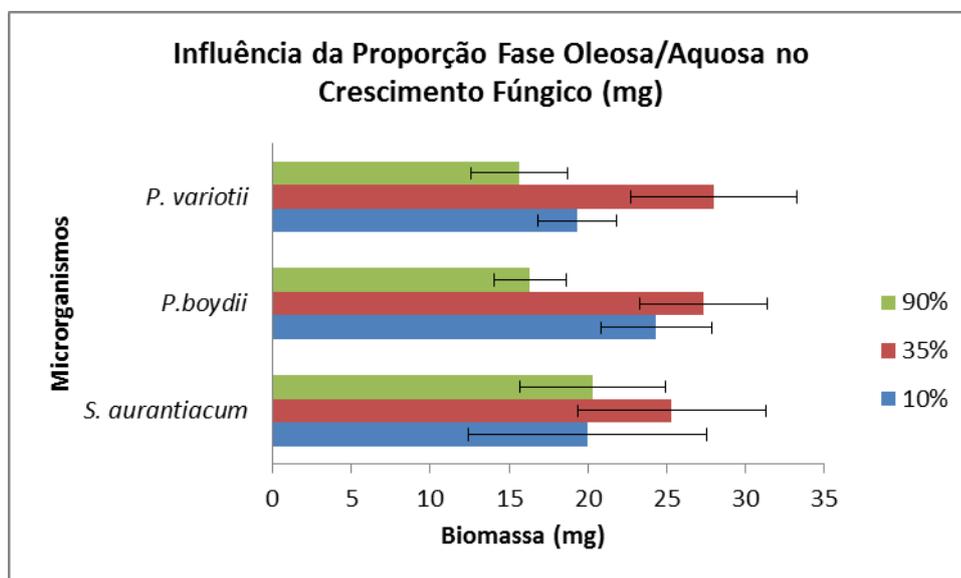
Para o fungo *Scedosporium aurantiacum* não houve diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) entre as diferentes proporções de óleo utilizadas. No entanto, os valores de biomassa obtidos indicam que a proporção de 35% é uma boa condição para o crescimento fúngico, dentre as proporções estudadas.

Cabe ressaltar que, na condição de 90% de biodiesel, este isolado obteve um desempenho melhor quando comparado ao isolado *P. boydii*. A biomassa produzida pelos micro-organismos nas diferentes proporções de óleo/água podem indicar que os fungos possuem exigências distintas quanto às necessidades de nutrientes e oxigênio para formar biomassa.

A maior formação de biomassa para os três micro-organismos estudados foi a condição de proporção intermediária, ou seja, com 35% de biodiesel (7mL de biodiesel como fase oleosa e 13mL de meio mínimo mineral Bushnell & Haas). O que indica que essa porcentagem de óleo e meio mineral permitem o acesso do microrganismo aos nutrientes e a oxigênio em quantidades necessárias para desenvolver-se, durante o tempo de estudo, utilizando biodiesel de soja como fonte de carbono.

Em um tanque de armazenamento real os valores da fase água presentes no sistema seria em torno de 1% com relação ao combustível estocado. Em nosso trabalho visualizamos o aumento da quantidade de água no sistema (de 10% para 65%) com conseqüente aumento da biomassa, o que

reforça o papel importante desse elemento para a contaminação e crescimento microbiano em um tanque de estocagem de combustível.



**Figura 13.** Valores de biomassa (mg) do crescimento dos fungos *P. boydii*, *S. aurantiacum* e *P. variotii* na interface Óleo/Água com diferentes proporções de óleo.

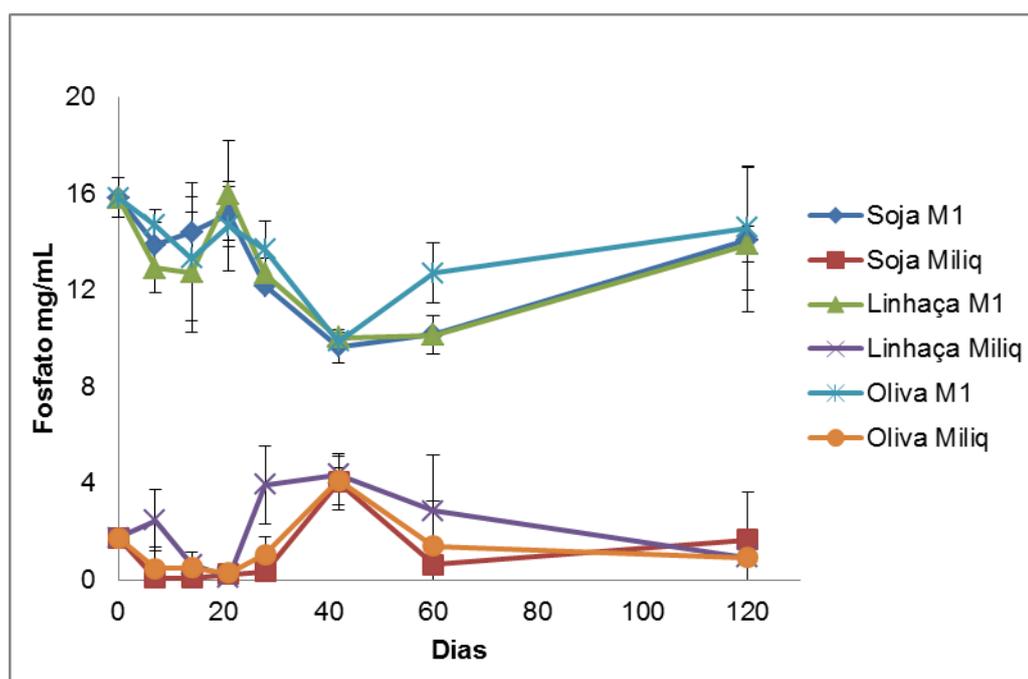
França *et al.* (2011) comparou a degradação de ésteres de biodiesel de soja em diferentes concentrações (10, 20 e 30%) e verificou que a influência na degradação pelos micro-organismos testados no estudo, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pichia guilliermondii*, é proveniente das diferentes concentrações do biocombustível. Obtiveram crescimento e consequente degradação de 80%; 33,9% e 25,7% pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa*; respectivamente nos testes realizados com 10%, 20% e 30% de biocombustível.

Indicando que a proporção de carbono a ser utilizada depende do metabolismo dos isolados empregados no estudo. Em nosso trabalho, como demonstrado na figura 13, na proporção acima de 35% de fase oleosa todos os

fungos diminuíram o seu crescimento, até abaixo da proporção menor utilizada (10%), indicando que a proporção óleo/água pode ser limitante aos micro-organismos utilizados no estudo.

### 5.1.5 Interação Fase Oleosa x Fase Aquosa

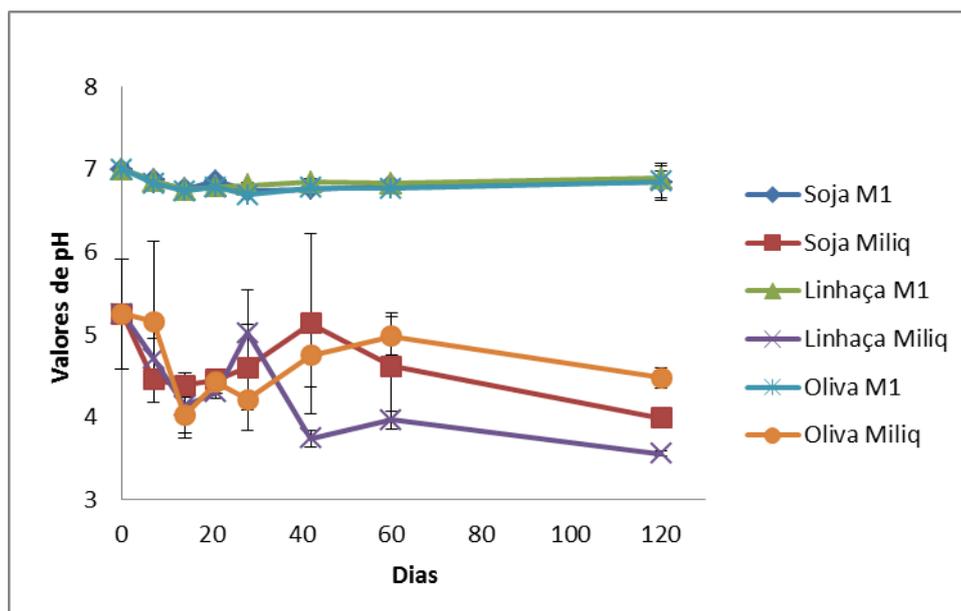
Para visualizar possíveis interações entre o biodiesel e a fase aquosa foi montado um experimento de 120 dias. O objetivo foi constatar possíveis migrações de compostos de uma fase para a outra. Os resultados das concentrações de fosfato monitoradas no meio mineral e na água MiliQ são mostrados na figura 14.



**Figura 14.** Variação na concentração de fosfato no Meio Mineral Bushnell & Haas e água ultrapura (MiliQ).

Pode-se observar que nos frascos onde o biodiesel interage com o meio mineral, houve redução na quantidade de fosfato até 14 dias de

incubação. Podemos observar também, a migração de pequenas quantidades de fosfato do biodiesel para o meio, dado o aumento nessas concentrações no tempo 21 para o meio mineral e no tempo 42, em água MiliQ.



**Figura 15.** Valores de pH do Meio Bushnell Haas e de água ultrapura (MiliQ) durante 120 dias de incubação.

Em relação ao pH do meio, não se observou alterações ao longo do tratamento, contrastando com as mudanças de pH detectadas na água MiliQ, apresentadas na figura 15. A água MiliQ é uma água ultrapura e é desprovida de fosfatos e agentes tamponantes, sendo assim podemos esperar a mudança do pH nessa água influenciado pela presença do biodiesel. Conforme os dados apresentados na figura 15, pode-se observar que o pH da água MiliQ diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos valores iniciais (7,0) ao final da curva de 120 dias.

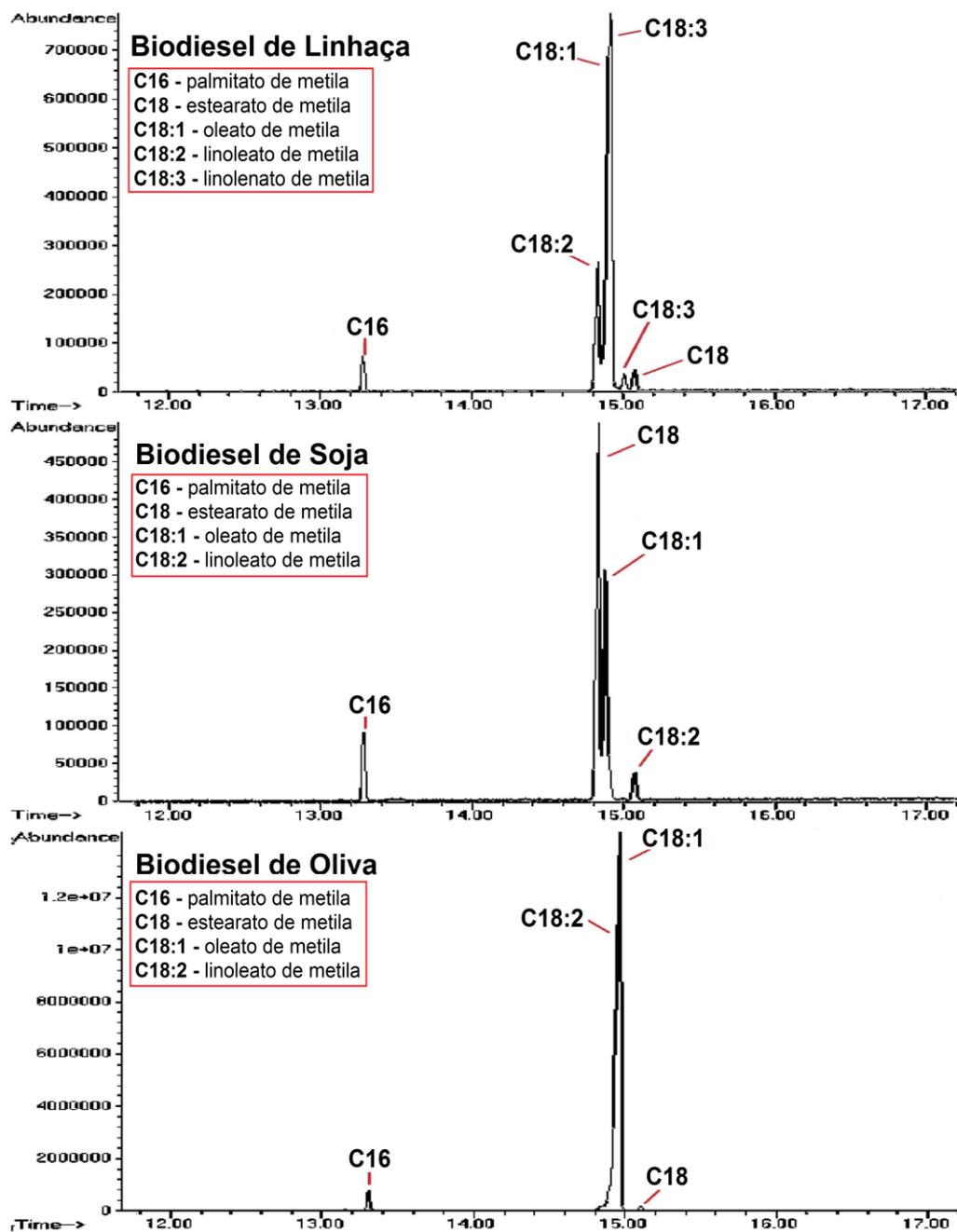
Para confirmar a migração de componentes do biodiesel para a fase aquosa, aos sete dias de cultivo, foi coletada a fase aquosa. Após a extração com diclorometano, analisou-se as amostras por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas.

Os resultados encontrados indicam que os ésteres de cadeia longa, presentes nos três biodieseis, parcialmente migram para a fase aquosa, e nela interferindo em algumas propriedades, como na tensão superficial, discutida mais adiante. Os ésteres encontrados estão detalhados na tabela 3 e demonstrados nos cromatogramas da figura 16.

**Tabela 3.** Ésteres componentes dos biodieseis encontrados nos meios minerais após 7 dias de incubação em condições estáticas. + presença, - ausência.

<b>Ésteres</b>	<b>Biodiesel de Linhaça</b>	<b>Biodiesel de soja</b>	<b>Biodiesel de Oliva</b>
<b>C16 – Palmitato de Metila</b>	+	+	+
<b>C18 – Estearato de Metila</b>	+	+	+
<b>C18:1 – Oleato de Metila</b>	+	+	+
<b>C18:2 – Linoleato de Metila</b>	+	+	+
<b>C18:3 – Linolenato de Metila</b>	+	-	-

Uma das características intrínsecas do biodiesel é a higroscopicidade. Muitos trabalhos apontam a influência do biodiesel no diesel e em como esse biocombustível poderia aumentar a habilidade das misturas em absorver água (Fregolente *et al.*, 2012; Yassine *et al.*, 2012). Essa constatação demonstra a interferência, por parte do biodiesel, em propriedades físicas e ambientais das misturas.



**Figura 16.** Perfil de ésteres de ácidos graxos presentes no meio mínimo mineral após sete dias de incubação, com biodiesel de linhaça, soja e oliva.

O aumento na viscosidade e diminuição nas emissões de material particulado nos mostram outras variáveis nas quais o biodiesel pode possuir

influência, conforme a sua quantidade aumenta nas misturas (Ramos *et al.*, 2003; Lôbo *et al.*, 2009; Candeia *et al.*, 2009).

Os resultados mostrados nesse trabalho nos indicam que a influência da adição de biodiesel nas misturas com diesel pode não limitar-se apenas ao aumento do crescimento microbiano, como citado anteriormente em trabalhos como Bücken *et al.* (2011).

Os dados apresentados em nosso trabalho, em escala laboratorial, confirmam a migração de ésteres da fase oleosa para a fase aquosa. A comunidade microbiana que normalmente utiliza os hidrocarbonetos da fase oleosa pode, pela presença de biodiesel, contar com diferentes ésteres disponíveis na fase aquosa para crescimento.

Neste cenário, a produção de biossurfactantes pelos fungos faz-se um gasto energético desnecessário para o microrganismo, já que é considerada um mecanismo fisiológico, utilizado por eles, para acessar o carbono presente na fase oleosa.

## 5.2 Fase de Avaliação

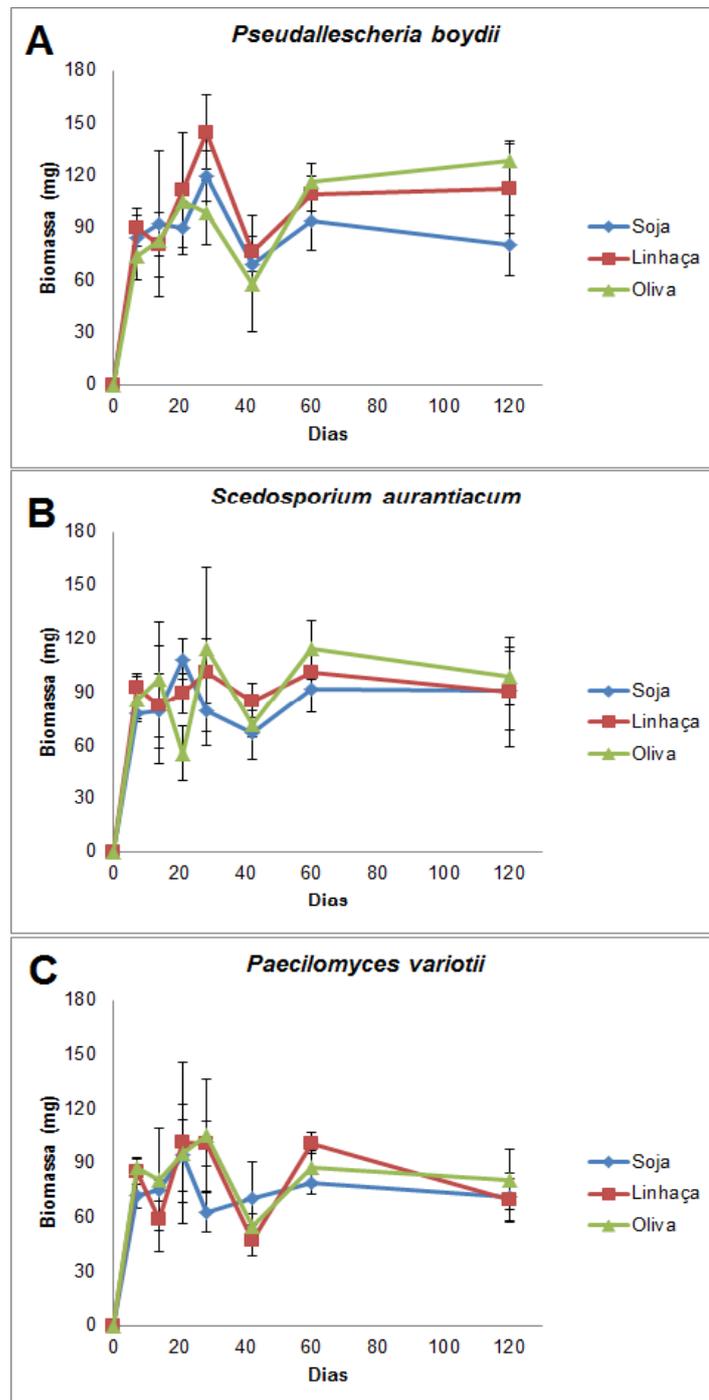
### 5.2.1 Crescimento Fúngico nos biodieseis analisados

Na avaliação do crescimento de *P. boydii*, *S. aurantiacum* e *P. variotii* em três biodieseis provenientes de óleo de linhaça, óleo de soja e óleo de oliva verificou-se que todas as fontes de carbono analisadas favoreceram o crescimento dos micro-organismos. O suporte mineral fornecido pelo meio Bushnell & Haas foi adequado para o desenvolvimento dos fungos avaliados, conforme apresentado figura 17.

Uma maior produção de biomassa pelo fungo *P. boydii* foi observada no biodiesel proveniente de óleo de linhaça aos 28 dias de análise. Ao final da curva (120 dias) os valores de biomassa entre os biodieseis foram distintos, sendo o maior crescimento detectado no biodiesel produzido a partir do óleo de oliva.

No entanto, quando analisamos a biomassa total, a biomassa produzida pelo fungo *P. boydii* no biodiesel de linhaça, foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que nos biodieseis de oliva e soja (731mg, 623mg e 647mg, respectivamente). Além disso, foi detectado para o isolado *S. aurantiacum* o maior valor de biomassa no biodiesel de oliva aos 28 dias de experimento, e no biodiesel de soja aos 21 dias de análise, como podemos observar na figura 17.

Os valores de biomassa entre os biodieseis para o fungo *S. aurantiacum* não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ). O crescimento total do isolado no biodiesel de linhaça foi maior que os demais biocombustíveis (616mg), quando o comparamos com os demais biodieseis de oliva e soja (605mg e 593mg, respectivamente).



**Figura 17.** Curvas de crescimento dos fungos filamentosos durante 120 dias em fase aquosa e oleosa composta por Biodiesel de Linhaça, Soja e Oliva. (a) *Pseudallescheria boydii*; (b) *Scedosporium aurantiacum*; (c) *Paecilomyces variotii*.

Nossos resultados indicam que o fungo *Paecilomyces variotii* foi capaz de utilizar todas as fontes de carbono utilizadas como suporte para seu crescimento. Uma maior produção de biomassa foi observada no biodiesel proveniente de óleo de oliva aos 28 dias de análise.

Ao final da curva (120 dias) os valores de biomassa entre os biodieseis não diferiram significativamente ( $p>0,05$ ), porém, na biomassa total, o crescimento do fungo *P. variotii* no biodiesel de oliva foi mais satisfatório que nos biodieseis de linhaça e soja ( $p<0,05$ ) (620mg, 526mg e 522mg, respectivamente).

A capacidade de fungos em se desenvolver em diesel e meio mineral Bushnell & Haas vem sendo avaliada há muito tempo. Hettige & Sheridan (1989) acompanharam o crescimento do fungo *Paecilomyces variotii* em sistemas contendo diesel como fase oleosa e meio Bushnell & Haas como fase aquosa e observaram a produção de 340mg após seis semanas de cultivo.

O crescimento de fungos em diesel metropolitano com meio mineral Bushnell & Haas foi avaliado por Bento & Gaylarde em 2001, e através desse experimento, foi constatado o crescimento de isolados fúngicos, como *Hormoconis resinae*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida silvícola*. Mais recentemente, Bückner *et al.* (2011) avaliaram, nas mesmas condições, o crescimento do fungo *Paecilomyces* sp., porém verificou-se que na presença de diesel puro (B0) o isolado apresenta um crescimento muito inferior quando comparado ao crescimento em biodiesel puro (B100) e suas misturas correspondentes (B5, B10 e B20). E, junto com nossos dados, esses trabalhos

confirmam a capacidade de fungos crescerem utilizando diesel e biodiesel como fonte de carbono usando o meio mineral Bushnell & Hass como aporte mineral para o seu desenvolvimento.

### **5.2.2 Concentração de Fosfato**

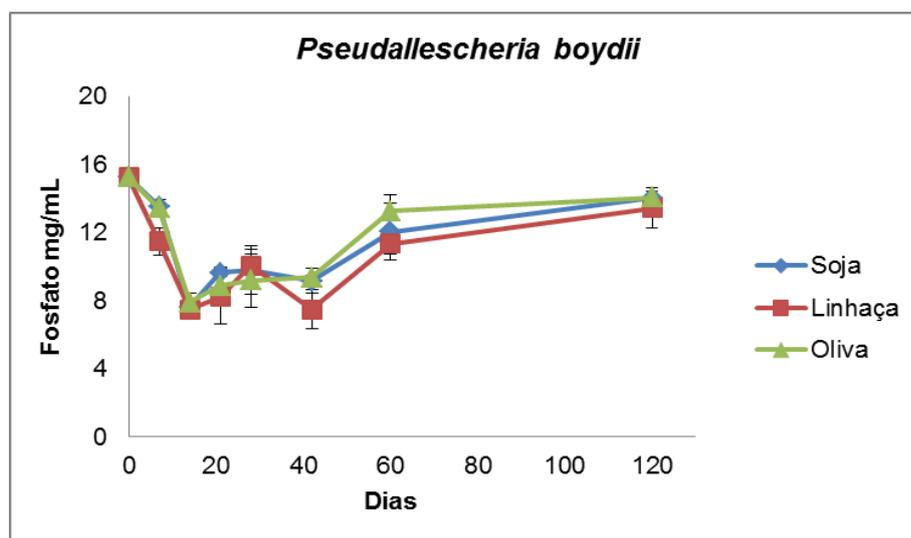
O fosfato é considerado um nutriente ativo e extremamente importante para o crescimento microbiano, sendo assim, seria esperado visualizar um consumo, mesmo que pequeno, desse composto em um sistema de microcosmos, como o utilizado nesse trabalho.

Os valores obtidos do monitoramento da concentração de fosfatos mostraram uma redução até os 42 dias de incubação, quando comparados aos valores iniciais, como demonstrados nas figuras 18, 19, 20 e 21. Essa redução foi observada em ambos os tratamentos, fungos e controles.

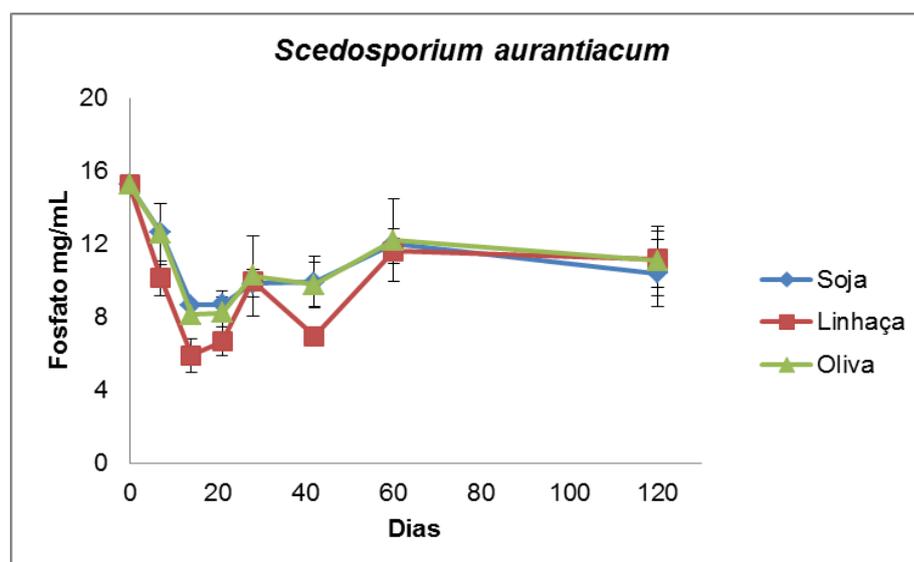
A redução e o posterior aumento na concentração de fósforo no meio de cultura podem decorrer do próprio crescimento fúngico, pois já é conhecido o papel desse elemento no crescimento microbiano, e quando ocorre morte celular, que pode ter sido causada pelos limites que o sistema do microcosmo impõe ao microrganismo, como por exemplo, falta de oxigênio e nutrientes escassos, o que podemos observar é uma liberação de compostos fosforados contidos na célula para o ambiente.

Segundo Passman (2003), o oxigênio é citado como um fator limitante ao desenvolvimento de populações microbianas aeróbias em sistemas de estocagem, e, portanto poderia ser o causador de morte celular em um

ambiente com oxigênio limitado, como é o caso dos microcosmos utilizados em nosso estudo.

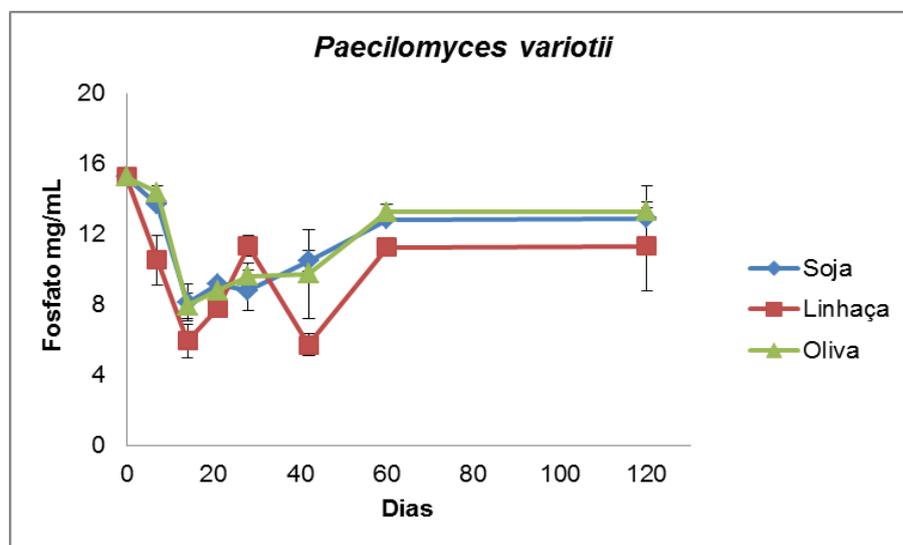


**Figura 18.** Valores de Concentração de fosfato durante a curva de crescimento do Fungo *Pseudallescheria boydii* em Biodiesel de Linhaça, Soja e Oliva.



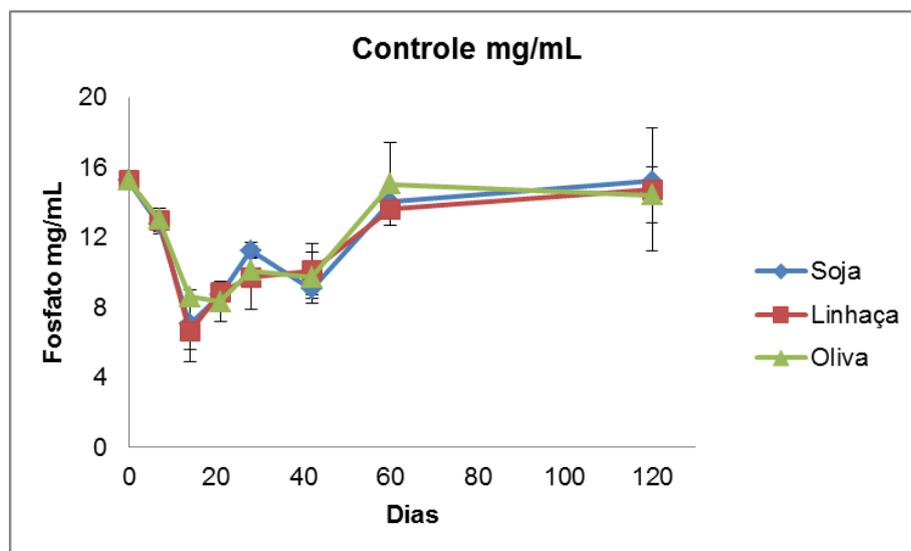
**Figura 19.** Valores de Concentração de fosfato durante a curva de crescimento do Fungo *Scedosporium aurantiacum* em Biodiesel de Linhaça, Soja e Oliva.

Esse consumo de fosfato inicial pode ser devido ao rápido crescimento inicial do microrganismo (Figura 17), e logo após, devido às limitações do sistema, é provável que tenha ocorrido morte celular, com lise de células provocando a liberação de conteúdo citoplasmático para o meio, indicada pelo aumento das concentrações de fosfatos após 40 dias de experimento.



**Figura 20.** Valores de Concentração de fosfato durante a curva de crescimento do Fungo *Paecilomyces variotii* em Biodiesel de Linhaça, Soja e Oliva.

Em nosso trabalho, no tratamento controle (figura 21) a concentração de fosfato não diferiu dos valores iniciais ( $p > 0,05$ ) ao final dos 120 dias de cultivo.



**Figura 21.** Valores de Concentração de fosfato no meio mineral (controle) durante a curva de crescimento em Biodiesel de Linhaça, Soja e Oliva.

Sendo assim, aos compararmos os tratamentos podemos propor que a falta deste nutriente no meio mineral que esteve em contato com o fungo deve-se a incorporação desse elemento no metabolismo celular. Ainda, a dinâmica deste elemento nos grupos controle pode ser explicado devido ao contato com o biodiesel, que possui em sua composição fosfatídeos (Lôbo *et al.*, 2009), e que podem migrar para a fase aquosa e vice-versa, levando às modificações dos valores observados ao longo do tempo.

Robertson & Alexander (1992) investigaram o crescimento de *Corynebacterium* sp. na presença de várias concentrações de fosfato e perceberam que o crescimento desse microrganismo era mais numeroso nas concentrações mais altas de fosfato (10 mM) e nas concentrações baixas de ferro (0,2 mM). Recentemente, Yang *et al.* (2010) otimizaram as condições de cultivo da bactéria *Ralstonia eutropha* aumentando a quantidade para até 130

mM de fosfato no meio de cultura, o que aumentou a produção de polihidroxialcanoato (PHA) a partir de ácidos orgânicos.

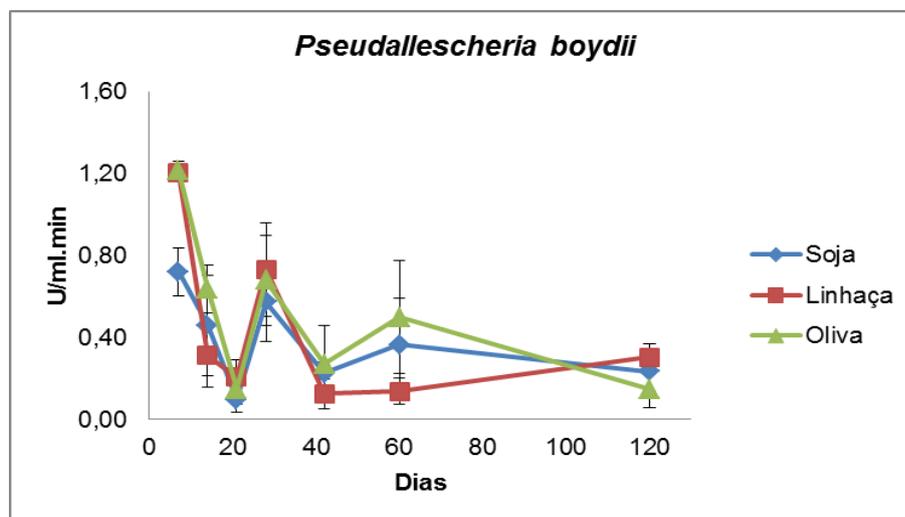
### 5.2.3 Produção de Lipase

Os valores da produção de lipase, nas condições de cultivo, com os fungos *P. boydii*, *S. aurantiacum* e *P. variotii* foram monitorados durante a curva de crescimento e são apresentadas nas figuras 22, 23 e 24. Podemos observar, os maiores valores da produção da enzima lipase ( $1,6 \text{ U/mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) ocorreram no início do experimento, aos sete dias, para todos os biodieseis de linhaça e oliva.

Para o biodiesel de soja essa produção foi menor ( $0,7 \text{ U/mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) quando comparada com os demais ( $p < 0,05$ ). Depois desse pico inicial houve uma redução em todos os biodieseis e para todos os fungos até o final dos 120 dias. Após o período de tempo inicial, nenhuma produção de lipase diferiu significativamente entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Este resultado indica que as fontes de carbono utilizadas não conseguiram induzir uma produção contínua da enzima lipase durante o tempo de cultivo analisado. Além disso, quando observamos a formação de biomassa verificamos que outras enzimas que não foram monitoradas podem estar sendo produzidas para suportar o crescimento microbiano nesses biodieseis.

Aos 28 dias um segundo pico de produção de lipase por todos os fungos, porém menor que o inicial, é observado. Quando comparamos esse dado com a produção de biomassa, o tempo 28 apresenta os maiores valores de crescimento para todos os fungos.



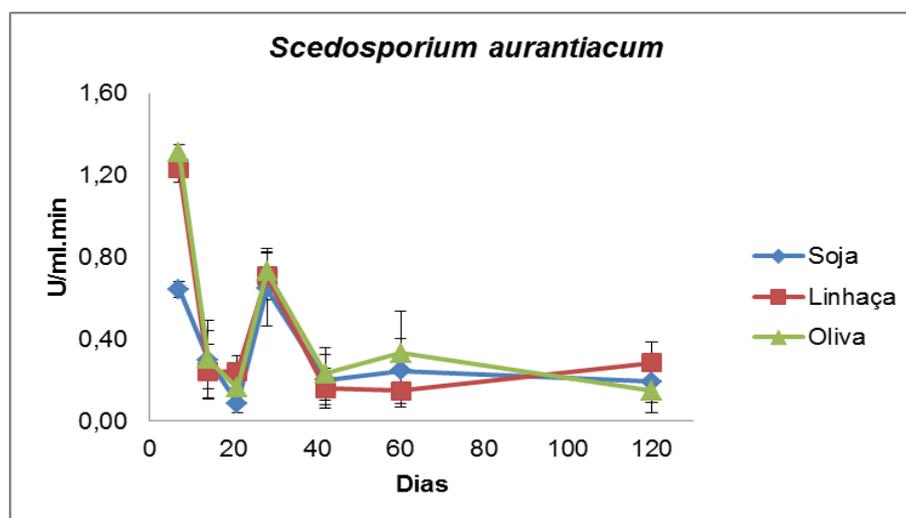
**Figura 22.** Atividade de lipase detectada do fungo filamentosso *P. boydii* durante 120 dias de incubação.

O que pode ter ocorrido foram duas fases de produção de lipase distintas: uma inicial para suportar a fase de adaptação ao biodiesel e o primeiro crescimento micelial, e uma posterior que induziu o restante do crescimento fúngico.

No entanto, após os 28 dias de cultivo, os limites impostos pelo sistema provavelmente provocaram a diminuição no metabolismo fúngico, indicado pelos valores de atividade enzimática próximos a zero, confirmando a estagnação do crescimento e consequente manutenção do peso dos fungos, observados na figura 17.

Considerando a produção de lipase em diferentes meios, Schultz (2010) obteve valores aproximados de  $1,55 \text{ U/mL}\cdot\text{min}^{-1}$  com seus isolados bacterianos, em meio mineral e a mistura B20 (diesel e biodiesel). Além disso, para o isolado F, identificado posteriormente como *Pseudallescheria boydii*,

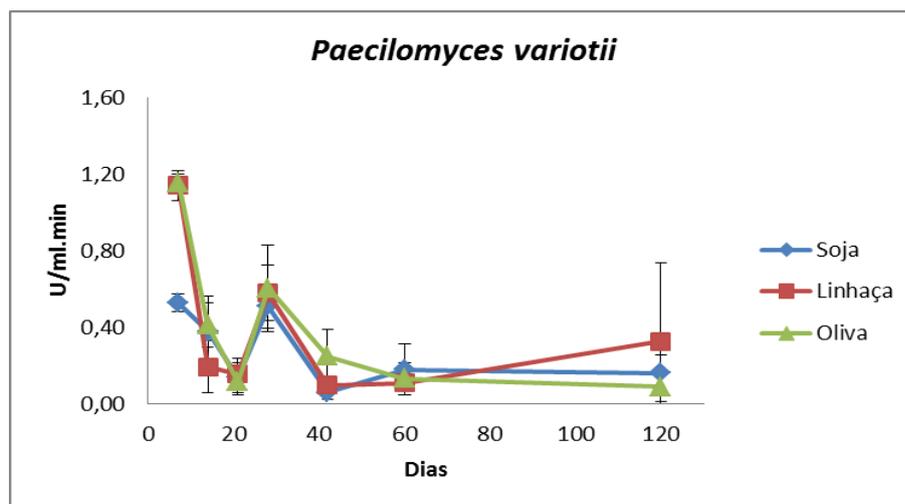
foram obtidos valores de 0,83 U/mL.min<sup>-1</sup> aos 14 dias de cultivo em B20 e B100.



**Figura 23.** Atividade de lipase detectada do fungo filamentoso *S. aurantiacum* durante 120 dias de incubação.

Em outro trabalho, Khudary *et al.* (2004) constatou uma atividade lipolítica máxima de 2,37U/mL em 60h de incubação pelo isolado bacteriano *Thermoactinomyces* sp. proveniente de solo contaminado com óleo de oliva. No entanto, os nossos fungos não apresentaram produção de lipase em longo prazo.

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos na interface óleo-água. Segundo Singh & Mukhopadhyay (2012), alguns dos fungos já detectados e considerados bons produtores de lipase são dos gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Candida*, e *Penicillium*. Em nosso trabalho pudemos detectar a produção dessa enzima pelos gêneros *Pseudallescheria*, *Scedosporium* e *Paecilomyces*.



**Figura 24.** Atividade de lipase detectada do fungo filamentosso *P. variotii* durante 120 dias de incubação.

No entanto, a produção de lipases por fungos filamentosos pode variar de acordo com a linhagem do isolado, a composição do meio de cultura, as condições, tempo de cultivo e o tipo de fonte de carbono e nitrogênio utilizados (Cihangir & Sarikaya, 2004). Muitos outros fatores podem afetar a produção dessa enzima pelos isolados, como pH, temperatura e aeração.

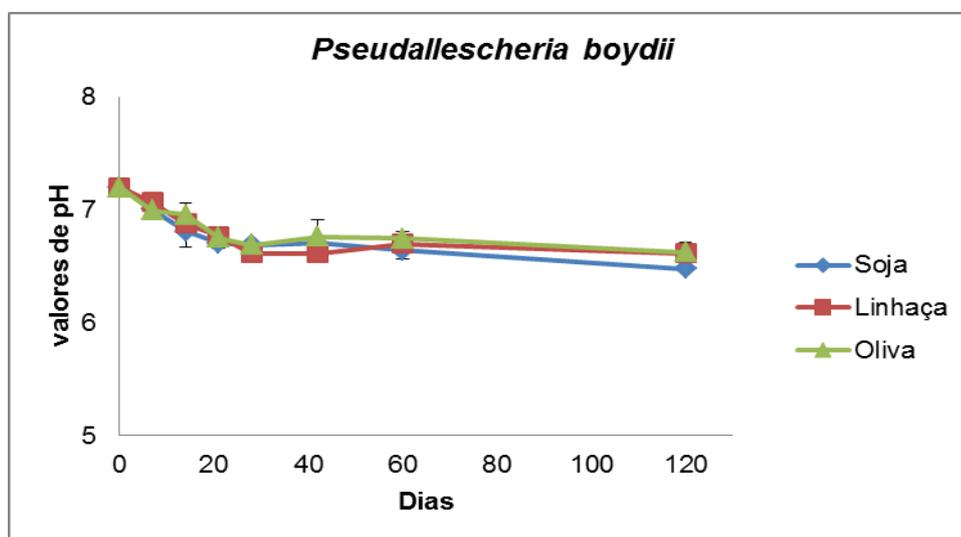
Além disso, a presença de triglicerídeos ou ácidos graxos tem sido relatada como indutora da secreção lipolítica por micro-organismos (Marek & Bednarski, 1996), e, como constatado no item 5.1.3, os ésteres que migram para a fase aquosa podem estar induzindo a atividade enzimática aos primeiros 7 dias de incubação.

#### 5.2.4 Valores de pH

Nos ensaios de crescimento com *P. boydii*, *S. aurantiacum* e *P. variotii* não se observou uma redução significativa das medidas de pH da fase aquosa até 21 dias de cultivo, quando comparadas ao pH inicial (7,2) ( $p > 0,05$ ).

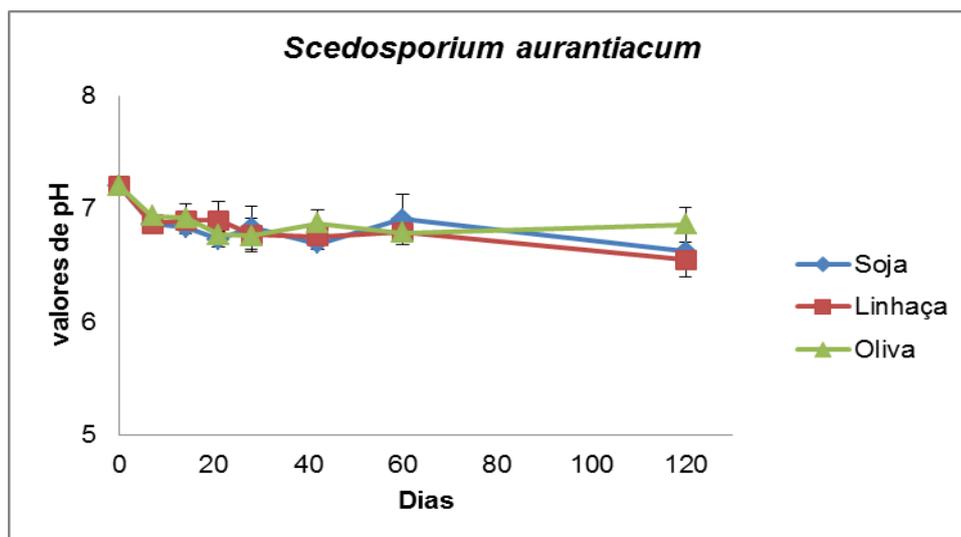
Após esse tempo pode-se ver uma redução ( $p < 0,05$ ) dos valores até o final dos 120 dias de incubação (6,5).

Nos tratamentos com os fungos não observamos diferenças significativas entre os biodieseis testados (oliva, soja e linhaça) em nenhum tempo amostrado ( $p > 0,05$ ). Nos tratamentos controle os valores de pH não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) dos valores iniciais durante todo o tempo do experimento (Figuras 25, 26, 27 e 28).

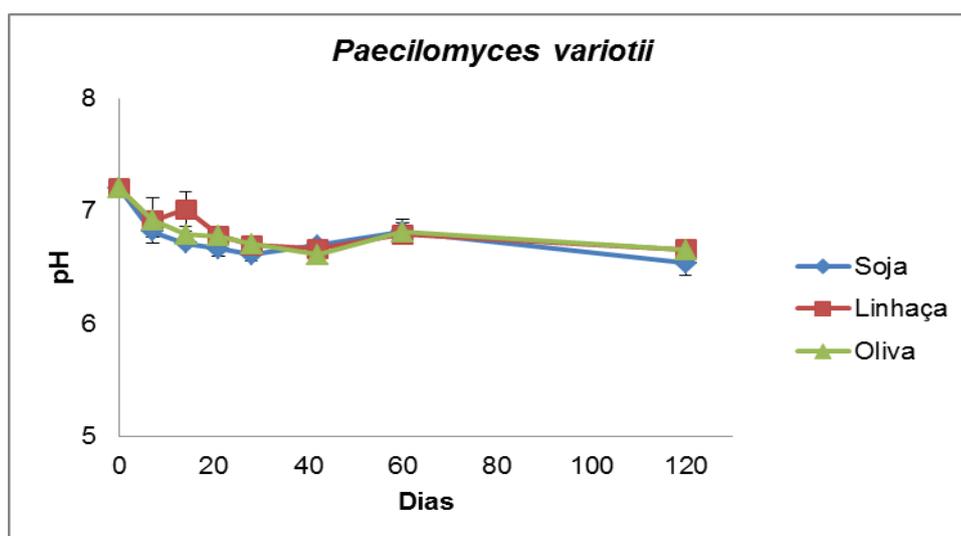


**Figura 25.** Valores de pH do crescimento do fungo filamentosso *P. boydii* em biodiesel de linhaça, soja e oliva.

As medidas de pH dos frascos controle sugerem que nos tratamentos com os fungos, podem estar sendo produzidas substâncias com caráter ácido decorrente do seu metabolismo durante o crescimento no sistema óleo-água, porém, em baixas concentrações ainda podem estar sendo tamponados devido à presença de fosfato na composição do meio.



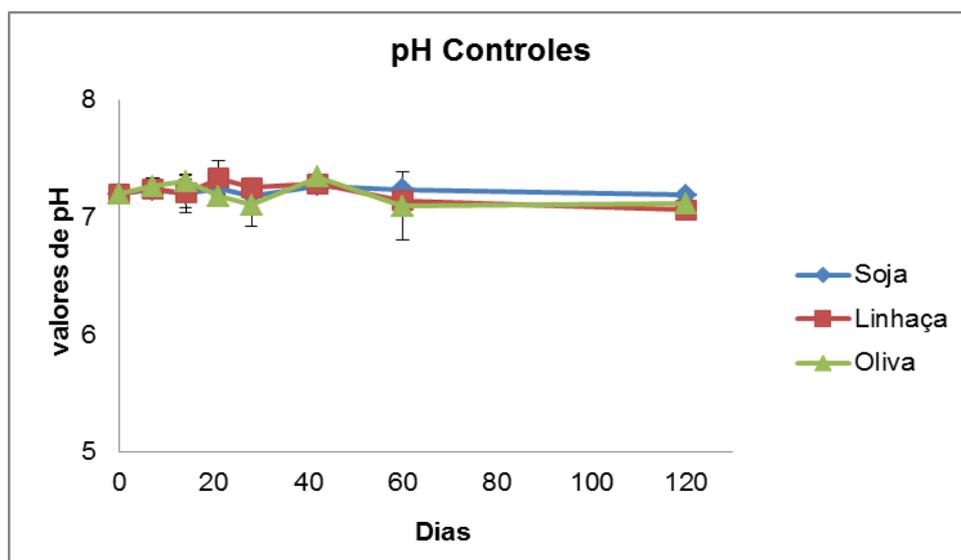
**Figura 26.** Valores de pH do crescimento do fungo filamentoso *S. aurantiacum* em biodiesel de linhaça, soja e oliva.



**Figura 27.** Valores de pH do crescimento do fungo filamentoso *P. variotii* em biodiesel de linhaça, soja e oliva.

Santos *et al.* (2007) correlacionaram o aumento da acidez do óleo bruto de dendê, durante seu armazenamento, à presença do fungo *Paecilomyces variotii*, indicando que este fungo é capaz de biotransformar o óleo e gerar ácidos graxos livres, os quais causam uma diminuição no pH.

Além dos produtos metabólitos formados durante o desenvolvimento em hidrocarbonetos, a redução do pH nos tratamentos pode estar relacionada a lises celulares, produtos poliméricos e produção de ácidos orgânicos (Parbey, 1970). O que pode ter sido a causa para a redução do pH observada em nosso experimento no tratamento com o isolado identificado como *P. variotii*.



**Figura 28.** Valores de pH do tratamento controle durante o crescimento fúngico em biodiesel de linhaça, soja e oliva.

A redução do pH da fase aquosa com os fungos em nosso experimento foi significativa a partir de 21 dias de incubação dos fungos quando comparado ao controle. Como foi comprovado crescimento (aumento da biomassa – figura 17), podemos sugerir que a ocorrência de baixa concentração de metabólitos ácidos ou a possibilidade de tamponamento do meio estejam envolvidos na variação de pH observada.

Como demonstrado nas figuras 18, 19, 20 e 21, o meio Bushnell & Haas possui uma concentração de fosfato capaz de mascarar possíveis

modificações no pH durante o crescimento microbiano (1,23 g/L) nas condições estudadas, o que reforça a hipótese anterior.

No entanto, é possível que em um sistema sem limitações de oxigênio e nutrientes, e com um maior tempo de cultivo, os isolados utilizados nesse trabalho possam vir a aumentar a produção desses metabólitos e demonstrar uma redução mais acentuada nos valores de pH.

### **5.2.5 Tensão Superficial da Fase Aquosa**

Os valores da tensão superficial da fase aquosa estudada nesse trabalho estão apresentadas na tabela 4. Esses valores exibiram uma queda logo nos primeiros dias de experimento ( $p < 0,05$ ), em todos os tratamentos (de  $55,4 \text{ mN/m}^{-1}$  para a média de  $38,0 \text{ mN/m}^{-1}$ ). Desta forma, nenhuma mudança significativa entre os tratamentos com os fungos e no tratamento controle foi observada ( $p > 0,05$ ).

Nestas condições os fungos estudados não produziram nenhum produto com capacidade surfactante. Esse comportamento dos valores de tensão superficial também foi observada por Bückner *et al.* (2011). Os fungos estudados por Bückner, *Paecilomyces* sp. e *Aspergillus fumigatus*, reduziram a tensão superficial da fase aquosa de  $53,8 \text{ mN/m}^{-1}$  para  $41,0 \text{ mN/m}^{-1}$  e para  $39,2 \text{ mN/m}^{-1}$ , respectivamente, em contato com biodiesel puro (B100), a mesma redução foi observada nos controles ( $38,7 \text{ mN/m}^{-1}$  e para  $40,2 \text{ mN/m}^{-1}$ ), o que indica que os isolados utilizados no trabalho não produziram nenhum produto surfactante durante os 60 dias de cultivo do experimento.

Sendo assim, os nossos resultados dos valores da tensão superficial, juntamente com os dados apresentados no item 5.1.5, confirmam a natureza do biodiesel de agir como um surfactante.

**Tabela 4.** Valores das medidas de Tensão superficial dos tempos 0, 7, 28, 60 e 120 dias de incubação da curva de crescimento dos fungos filamentos com biodiesel de linhaça, soja e oliva. Valores iniciais do meio mínimo mineral: 55,4 mN.m<sup>-1</sup>.

<i>Controle</i>				<i>S. aurantiacum</i>			
Tempo de Incubação	Linhaça	Soja	Oliva	Tempo de Incubação	Linhaça	Soja	Oliva
0 dias	55,4±2,8	55,4±2,8	55,4±2,8	0 dias	55,4±2,8	55,4±2,8	55,4±2,8
7 dias	35,3±0,8	36,3±0,5	35,3±1,2	7 dias	38,5±1,3	42,1±1,5	39,5±0,7
28 dias	40,0±0,3	38,5±0,6	38,3±1,8	28 dias	37,0±3,1	39,0±0,3	38,4±1,3
60 dias	39,6±0,1	40,6±0,4	39,8±1,5	60 dias	42,9±0,8	43,6±1,3	43,2±0,1
120 dias	39,4±0,7	37,9±1,2	38,9±0,5	120 dias	41,8±0,5	42,8±1,7	40,0±1,3
<i>P. boydii</i>				<i>P. variotii</i>			
Tempo de Incubação	Linhaça	Soja	Oliva	Tempo de Incubação	Linhaça	Soja	Oliva
0 dias	55,4±2,8	55,4±2,8	55,4±2,8	0 dias	55,4±2,8	55,4±2,8	55,4±2,8
7 dias	35,7±1,7	40,3±1,2	35,2±2,8	7 dias	36,3±2,5	41,3±1,1	39,0±1,0
28 dias	39,7±0,9	42,9±0,4	39,9±0,7	28 dias	39,5±0,2	42,1±1,5	39,5±0,1
60 dias	43,0±0,2	44,3±0,3	43,4±1,1	60 dias	40,4±0,3	42,3±0,9	41,4±1,7
120 dias	41,3±2,6	40,9±0,1	41,3±1,6	120 dias	40,0±0,6	40,7±1,6	41,6±0,5

A redução da tensão superficial das fases aquosas obtidas nesse trabalho pode estar relacionada à composição intrínseca do biodiesel, que é rica em ésteres de ácidos graxos. Estes ésteres dividem semelhanças entre sua estrutura química com a estrutura de alguns tipos de surfactantes, e, sendo

assim, podem agir como um surfactante na presença de água e reduzir a tensão superficial (Nitschke & Pastore, 2002).

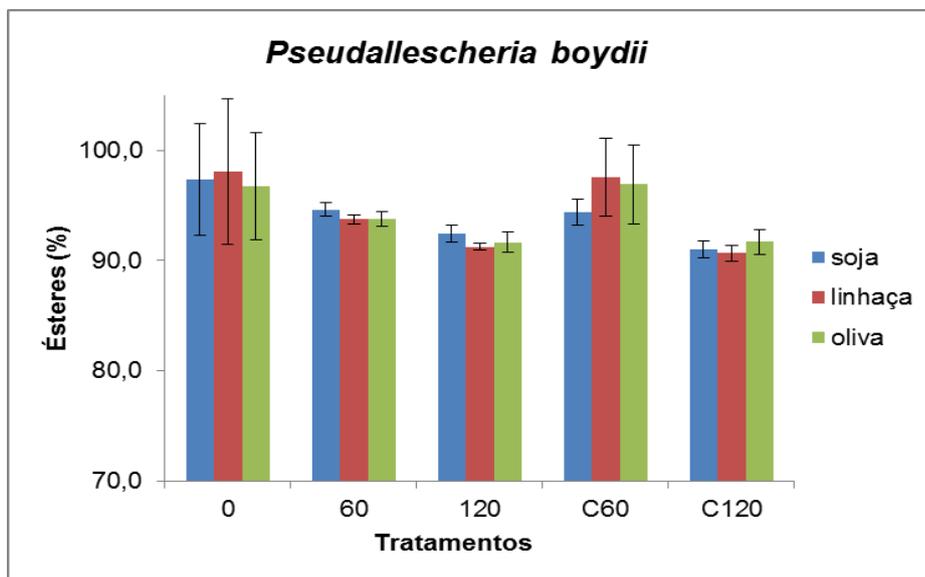
Outros estudos já relataram que só a presença de biodiesel nas misturas com diesel já demonstra a habilidade desse composto de reduzir os valores de tensão superficial do meio mineral como fase aquosa com as misturas (B5, B10 e B20) como fase oleosa, devido as suas características físico-químicas (Meyer, 2010; Souza, 2012).

### **5.2.6 Degradação dos Ésteres**

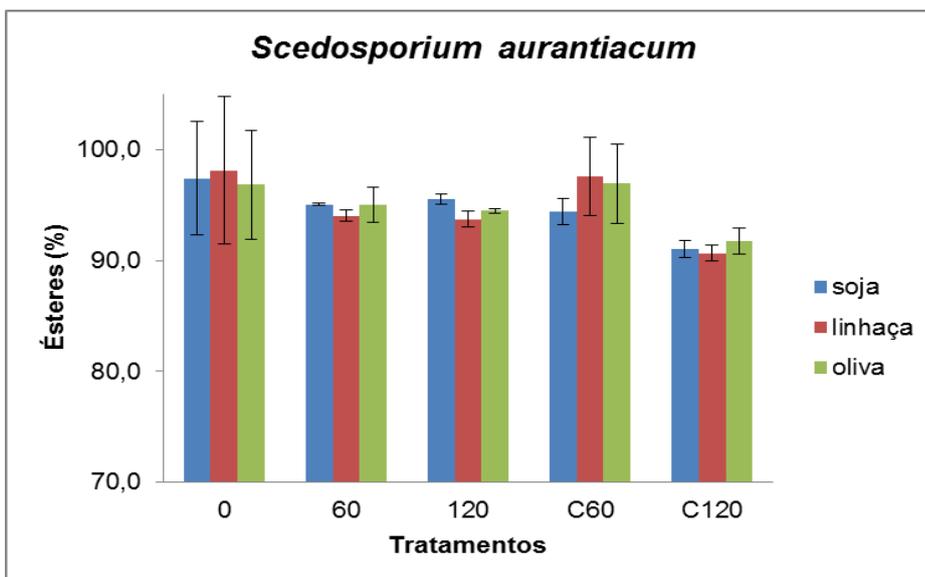
Os resultados de degradação dos ésteres do biodiesel estão apresentados nas figuras 29, 30 e 31. Conforme os valores obtidos dos ésteres totais detectados no tratamento controle (sem fungo) e com os fungos não foram observadas reduções significativas, após 60 e 120 dias ( $p > 0,05$ ).

Quando visualizamos as médias obtidas para cada biodiesel observa-se a tendência de diminuição dos valores do tempo zero dias ao tempo 120 dias para todos os fungos. Porém ao analisar os controles essa tendência também é observada, o que pode estar relacionado com processos de degradação abiótica, devido ao contato com a fase aquosa (meio mineral), indicando a não influência do fungo na diminuição das médias dos ésteres totais, presentes nos biodieseis analisados, ao longo do tempo.

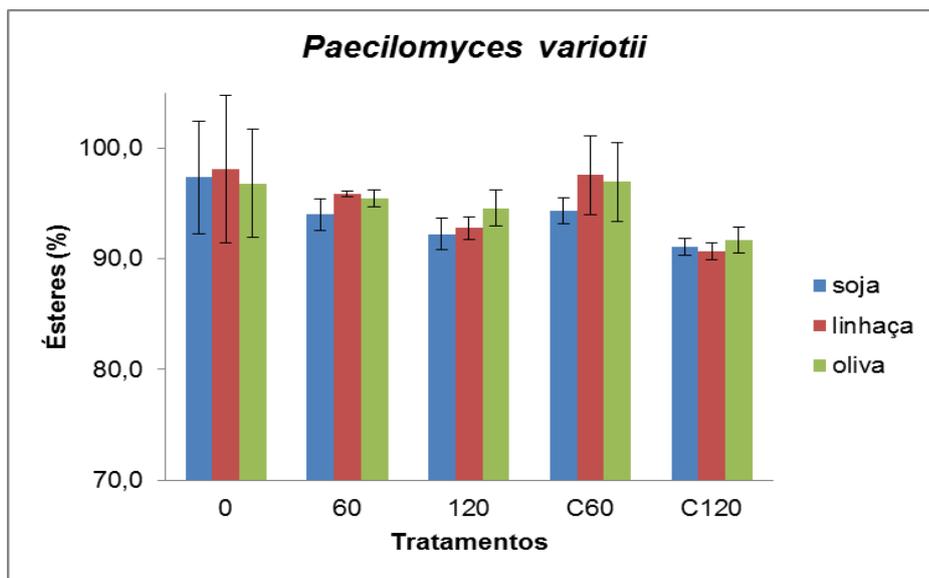
Conforme os resultados da migração dos ésteres do biodiesel para a fase aquosa citados no item 5.1.5, pode-se, então, sugerir que os fungos provavelmente tenham utilizado essa fonte de carbono em seu desenvolvimento.



**Figura 29.** Porcentagem de ésteres de ácidos graxos presentes nos biodieseis de linhaça, soja e oliva, durante a curva de crescimento do fungo *P. boydii* e com o tratamento controle. (C – controle)



**Figura 30.** Porcentagem de ésteres de ácidos graxos presentes nos biodieseis de linhaça, soja e oliva, durante a curva de crescimento do fungo *S. aurantiacum* e com o tratamento controle. (C – controle)



**Figura 31.** Porcentagem de ésteres de ácidos graxos presentes nos biodieseis de linhaça, soja e oliva, durante a curva de crescimento do fungo *P. variotii* e com o tratamento controle. (C – controle)

Estudos anteriores também constataram baixa degradação dos ésteres por fungos em condições similares de crescimento, apontando que outros componentes do biodiesel, como a glicerina, ou mesmo os compostos mono, di ou triacilglicerídeos podem estar sendo consumidos pelos fungos, e aumentando a suscetibilidade do biodiesel à contaminação microbiana (Bücker *et al.*, 2010, Schultz, 2010; Cazarolli *et al.*, 2012).

De acordo com Mehdi & Giti (2008), a velocidade da biodegradação depende da concentração e da composição do óleo, da existência no sistema de micro-organismos capazes de utilizar o combustível estocado como fonte de carbono e de um grupo de moléculas, denominadas biossurfactantes. O isolado *Pseudomonas stutzeri*, proveniente de solo contaminado com óleo bruto, foi usado para degradar o óleo diesel durante 14 dias (Yemanshova *et al.*, 2007). Após o período de incubação foi observado a degradação de 88% do óleo

diesel no tratamento que recebeu 120mg de surfactante ramnolípídeo, em contraste com o tratamento em que não foi adicionado nenhum surfactante (54% de degradação) (Kaczorek *et al.*, 2011).

Em nosso trabalho não foi detectado produção dessas moléculas, ao contrário, o próprio biodiesel teve um efeito surfactante no meio mineral utilizado. Essa característica pode ter influenciado nos resultados observados nas figuras 29, 30 e 31.

Um estudo avaliou a biodegradabilidade de biodiesel e seus efeitos sobre a diversidade microbiana de um solo contaminado com diesel (B0), as misturas (B5, B20 e B50) e biodiesel (B100), em microcosmos com solo da Mata Atlântica (Silva *et al.*, 2012).

As análises cromatográficas revelaram que os microcosmos contaminados com as misturas B20 com biodiesel puro (B100) foram os mais degradados entre os tratamentos (80% e 84% de degradação, respectivamente), confirmando os resultados encontrados por Pasqualino *et al.* (2006), que indicaram que quanto maior a adição de biodiesel na mistura menor o tempo necessário para se atingir 50% de biodegradação.

No entanto, Schleicher *et al.* (2009), observaram o crescimento bacteriano mais eficiente em misturas de B20, quando os resultados foram comparados aos de B100. O que, juntamente com nossos dados, indicam que a competência microbiana em crescer utilizando ésteres de ácidos graxos pode ser muito variada, seja com micro-organismos isolados ou em um consórcio microbiano.

Outro trabalho observou a preferência de um micro-organismo em degradar outros compostos que não biodiesel. Souza (2012) observou o crescimento da bactéria *Serratia marcescens* em biodiesel, e, pela técnica de espectroscopia de infravermelho, também não foi detectada degradação para o B100 (biodiesel de soja e gordura animal – 70/30%) testado.

### **5.3 Controle do Crescimento Microbiano**

Na Tabela 5 podemos observar o tempo de ação esporo estática e na tabela 6 podemos observar a ação esporicida dos quatro diferentes antimicrobianos testados com os seguintes micro-organismos: *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium aurantiacum* e *Paecilomyces variotii* em caldo malte por 15 dias.

A concentração máxima utilizada de 2 g/L do MBO 8% não inibiu o desenvolvimento do fungo *P. boydii* no meio caldo malte, assim como para os demais isolados e para os antimicrobianos MBO 50% e MBO 100% com 15 dias de incubação. Para o NBM 100%, ao final do tempo de cultivo, 0,5 g/L da concentração utilizada foram efetivos no controle do crescimento dos isolados *P. boydii* e *P. variotii*, e para o isolado *S. aurantiacum* apenas 0,25 g/L foram eficazes na inibição do seu crescimento.

**Tabela 5.** Resultados da CMI (g/L) em função dos quatro diferentes antimicrobianos testados com os seguintes micro-organismos: *P. boydii*, *S. aurantiacum* e *P. variotii*. (+) crescimento detectado.

<b>Concentração Mínima Inibitória – CMI (g/L)</b>				
Fungo	<b><i>P. boydii</i></b>			
	<b>MBO 8%</b>	<b>MBO 50%</b>	<b>MBO 100%</b>	<b>NBM 100%</b>
24h	2	0,5	0,016	0,002
48h	+	0,5	0,25	0,016
5dias	+	2	1	0,125
7dias	+	2	2	0,250
10dias	+	2	2	0,250
15dias	+	2	2	0,500
Fungo	<b><i>S. aurantiacum</i></b>			
	<b>MBO 8%</b>	<b>MBO 50%</b>	<b>MBO 100%</b>	<b>NBM 100%</b>
24h	0,5	2	0,032	0,002
48h	+	2	0,5	0,016
5dias	+	2	1	0,064
7dias	+	2	2	0,125
10dias	+	+	2	0,125
15dias	+	+	2	0,25
Fungo	<b><i>P. variotii</i></b>			
	<b>MBO 8%</b>	<b>MBO 50%</b>	<b>MBO 100%</b>	<b>NBM 100%</b>
24h	2	2	0,125	0,008
48h	+	+	0,25	0,064
5dias	+	+	2	0,25
7dias	+	+	2	0,25
10dias	+	+	2	0,5
15dias	+	+	2	0,5

A ação esporicida sobre os isolados *P. boydii* e *S. aurantiacum* foram necessários 10 dias de contato com uma dose alta do MBO 100% (2 g/L) (Tabela 6). Para o NBM 100%, a ação esporicida ocorreu no mesmo tempo (10 dias) com 0,25 g/L para *P. boydii* e *P. variotii* e 0,125 g/L para o isolado *S. aurantiacum*.

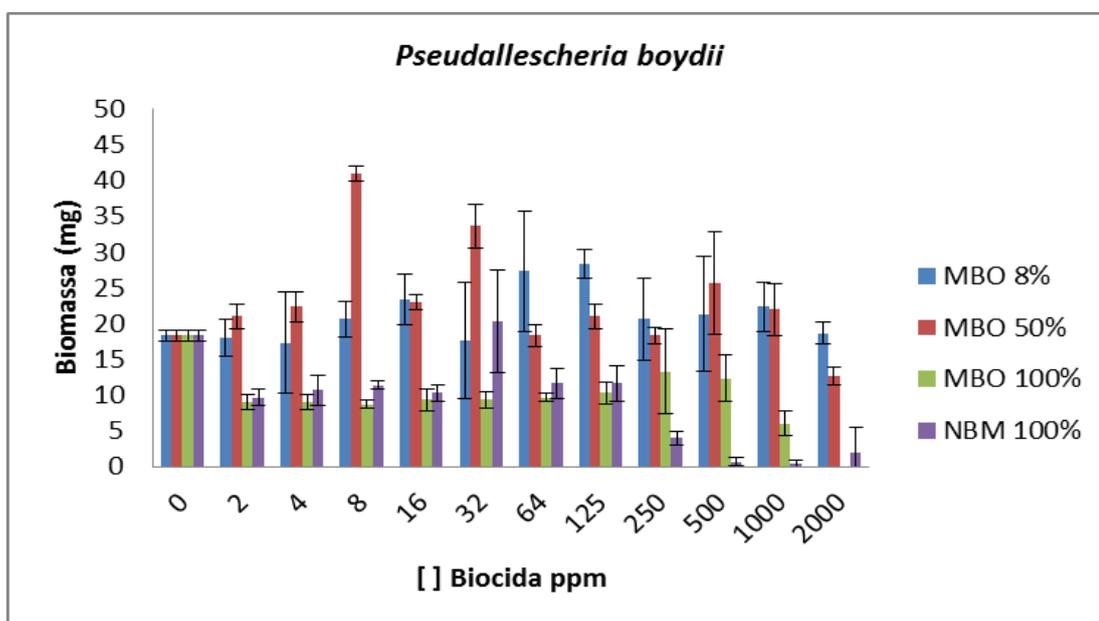
**Tabela 6.** Resultados da CMB (g/L) em função dos quatro diferentes antimicrobianos testados com os seguintes micro-organismos: *P. boydii*, *S. aurantiacum* e *P. variotii*. (+) crescimento detectado.

<b>Concentração Mínima Biocida – CMB (g/L)</b>				
<b>Fungo</b>	<b><i>P. boydii</i></b>			
	<b>MBO 8%</b>	<b>MBO 50%</b>	<b>MBO 100%</b>	<b>NBM 100%</b>
<b>24h</b>	+	0,5	+	+
<b>48h</b>	+	0,5	+	+
<b>5dias</b>	+	+	+	0,5
<b>7dias</b>	+	+	+	0,5
<b>10dias</b>	+	+	2	0,25
<b>15dias</b>	+	+	2	0,25
<b>Fungo</b>	<b><i>S. aurantiacum</i></b>			
	<b>MBO 8%</b>	<b>MBO 50%</b>	<b>MBO 100%</b>	<b>NBM 100%</b>
<b>24h</b>	+	+	+	0,25
<b>48h</b>	+	+	+	0,25
<b>5dias</b>	+	+	+	0,25
<b>7dias</b>	+	+	+	0,25
<b>10dias</b>	+	+	2	0,125
<b>15dias</b>	+	+	2	0,125
<b>Fungo</b>	<b><i>P. variotii</i></b>			
	<b>MBO 8%</b>	<b>MBO 50%</b>	<b>MBO 100%</b>	<b>NBM 100%</b>
<b>24h</b>	+	+	+	+
<b>48h</b>	+	+	+	+
<b>5dias</b>	+	+	+	+
<b>7dias</b>	+	+	+	+
<b>10dias</b>	+	+	+	0,25
<b>15dias</b>	+	+	+	0,25

Os antimicrobianos MBO 8% e MBO 50% não demonstraram ação esporicida sobre nenhum dos isolados, porém, para os fungos utilizados nesse trabalho, uma ação detectada foi a redução na biomassa formada ao longo do tempo, quando comparamos as concentrações de 2 g/L e a de 0 g/L, como constatada nas figuras 32, 33 e 34.

Estes resultados mostram que os esporos fúngicos foram mais suscetíveis a concentrações mais baixas de dimorfolina (NBM 100%), quando comparados aos resultados que obtivemos com oxazolidinas (antimicrobianos MBO 8%, MBO 50% e MBO 100%).

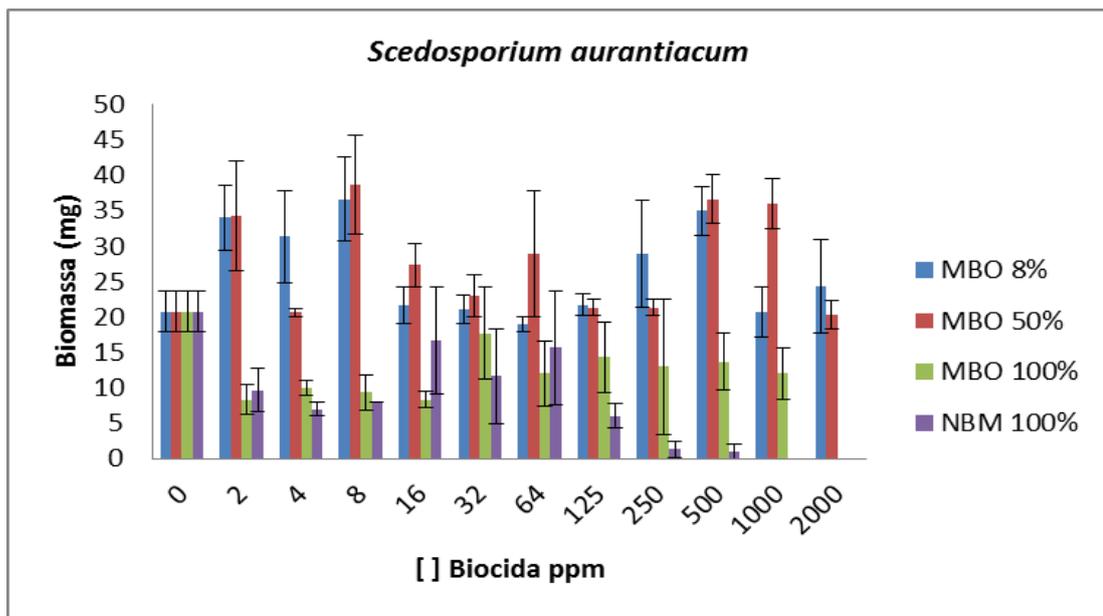
Um biocida é considerado efetivo quando é capaz de comprometer a permeabilidade celular, e provocar danos irreparáveis, como a perda de constituintes celulares (Diehl & Chapman, 1999). No caso de fungos, esse composto deve conseguir penetrar o córtex (envoltório) do esporo, que é extremamente rígido, e para isso o tempo para a penetração pode ser maior do que o requerido para eliminar uma célula em estado vegetativo.



**Figura 32.** Valores de Biomassa nos frascos com diferentes concentrações dos antimicrobianos utilizadas para controlar o crescimento do fungo *Pseudallescheria boydii* por 15 dias de cultivo.

Compostos como benzimidazol, carbendazim e thiabendazole são algumas das substâncias utilizadas mundialmente e que são capazes de inibir o crescimento fúngico, agindo sobre elementos da divisão celular e estabilidade da membrana plasmática (Stenersen, 2004).

Além disso, já é bem estabelecida na literatura a capacidade dos micro-organismos em desenvolver resistência a substâncias nocivas ao seu crescimento (Ramos & Alonso, 2011; Torres García, 2012; Morente *et al.*, 2013).

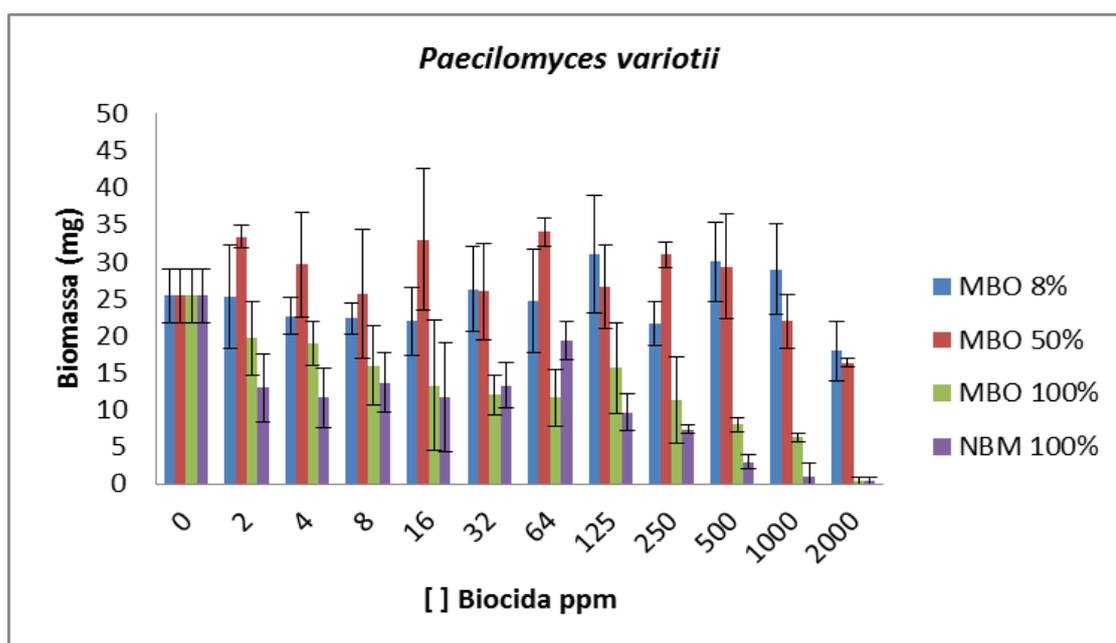


**Figura 33.** Valores de Biomassa nos frascos com diferentes concentrações dos antimicrobianos utilizadas para controlar o crescimento do fungo *Scedosporium aurantiacum* por 15 dias de cultivo.

A possibilidade dos micro-organismos estabelecidos em um tanque apresentarem resistência ou diminuírem sua suscetibilidade aos ingredientes ativos dos antimicrobianos é real, e tem sido um problema a ser considerado

na aplicação desses produtos (Gaylarde, 1995, Russel, 2003; Cloete, 2003, Raikos *et al.*, 2012; Passman, 2013).

Em nosso trabalho observamos um aumento gradual nas concentrações de antimicrobianos aplicadas os quais eram capazes de controlar o crescimento fúngico. Nas primeiras 24h, concentrações baixas dos antimicrobianos MBO 100% e NBM 100% foram suficientes para inibir o crescimento dos fungos *P. boydii* (0,016 g/L e 0,002 g/L), *S. aurantiacum* (0,032 g/L e 0,002 g/L) e *P. variotii* (0,125 g/L e 0,008 g/L, respectivamente) como observado na tabela 5.



**Figura 34.** Valores de Biomassa nos frascos com diferentes concentrações dos antimicrobianos utilizadas para controlar o crescimento do fungo *Paecilomyces variotii* por 15 dias de cultivo.

No entanto, cinco dias depois já era necessária a aplicação de concentrações superiores (mais de 0,5 g/L) para obter o mesmo efeito. Esses dados nos indicam a possibilidade dos fungos estarem desenvolvendo uma resistência ao antimicrobiano, sendo indispensáveis concentrações mais altas para controlar o crescimento fúngico.

Os valores de CMI e CMB são uma avaliação orientativa para a aplicação do antimicrobiano e são dependentes do grupo microbiano a ser tratado, pois diferentes micro-organismos podem apresentar suscetibilidades distintas aos produtos aplicados. As concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima biocida (CMB) podem indicar a concentração do antimicrobiano a ser utilizada, de modo que não se aplique quantidades acima das necessárias, ou quantidades que não sejam suficientes para controlar o desenvolvimento das populações (ANVISA, 2002; Chelossi & Faimali, 2006; Cury *et al.*, 2007).

Os valores relativos às CMI e CMB obtidas neste trabalho indicaram a eficiência de apenas um dos produtos antimicrobianos testados, do qual com baixas concentrações obtivemos efeito no controle dos micro-organismos. O antimicrobiano NBM 100% que contém a molécula dimorfolina como ingrediente ativo exerceu ação esporicida contra a população microbiana com valores inferiores a 0,5 g/L, como indicado na tabela 5 e nas figuras 32, 33 e 34. Os valores orientativos, obtidos nesse trabalho, estão de acordo com os valores de aplicação indicados pelo fabricante para o produto (0,5 g/L – 1 g/L).

Passman (2005) avaliou o efeito de um biocida com isotiazolonas como ingrediente ativo (CMIT/MIT) (0,22 g/L) sobre a formação de biomassa em sistemas contendo água de lastro sintética como fase aquosa e biodiesel

de óleo de coco como fase oleosa. Após 3 meses pode observar a diminuição da biomassa nos frascos contendo o produto CMIT/MIT em comparação àqueles em que não foi adicionado nenhum biocida.

A avaliação da efetividade dos antimicrobianos em um sistema contendo uma fase aquosa e uma fase oleosa, e contaminado por uma população microbiana, torna-se imprescindíveis para se determinar a eficácia do produto. No estudo de Bucker (2010), foi observado que a concentração de 0,064 g/L de isotiazolona (CMIT/MIT) foi mais esporicida ao microrganismo *Paecilomyces* sp. quando comparada a concentração de 0,125 g/L de oxazolidinas.

Zimmer *et al.* (2011) utilizou um inóculo sugerido na norma ASTM E1259 – 10 e analisou a eficácia de antimicrobianos em controlar o crescimento deste inóculo, em microcosmos contendo uma fase aquosa e os combustíveis B0, B7, B10 e B100 como fase oleosa.

Ao final de 60 dias verificaram que a efetividade dos produtos dependia da natureza do combustível a ser tratado. Além disso, a molécula isotiazolona, nas condições do experimento, foi mais eficaz que o produto contendo a molécula de oxazolidina, o que só reforça a necessidade de se levar em consideração o combustível que o biocida escolhido irá tratar.

Moléculas isotiazolonas possuem seu mecanismo de ação composto por dois passos: agem rapidamente inibindo em minutos o crescimento e metabolismo, seguido por dano celular irreversível resultando em perda da viabilidade celular. As células são inibidas pela ruptura dos ciclos metabólicos envolvendo enzimas desidrogenases (Williams, 2007).

No presente trabalho nenhuma concentração menor que 2 g/L dos MBO 8%, MBO 50% e MBO 100%, compostos por oxazolidinas, foi capaz de controlar e prevenir o crescimento dos três micro-organismos, inviabilizando as células e os esporos apenas após 15 dias e com concentrações altas de produto (tabela 5).

Em nosso trabalho o produto NBM 100%, cujo princípio ativo é a molécula dimorfolina, foi mais eficaz no controle de todos os fungos, quando comparado aos antimicrobianos com princípio ativo de oxazolidinas (Tabela 5). As morfolinas são capazes de inibir enzimas envolvidas na síntese de ergosterol (estrutura lipídica que confere estabilidade à membrana celular) da célula fúngica, alterando a integridade da membrana celular, havendo dificuldade em resistir à pressão osmótica intracelular e, como consequência ocorre a lise celular (Stenersen, 2004).

A ação das oxazolidinas está relacionada à inibição da síntese de proteínas, pois essa molécula liga-se ao sítio P da subunidade maior do ribossomo, impedindo a formação do complexo de iniciação da tradução (Mukhtar & Wright, 2005; Devasahayam *et al.*, 2010).

O biocida com seu princípio ativo baseado em oxazolidina nesse trabalho somente foi eficaz em concentrações mais altas, como podemos observar nas diferenças entre o MBO 8% e o MBO 50% (Tabela 5). Os antimicrobianos MBO 8% e o MBO 50% quando comparados aos antimicrobianos MBO 100% e NBM 100% foram menos efetivos ao diminuir a biomassa dos isolados, como demonstrado nas figuras 32, 33 e 34.

Ao final de 15 dias, o produto contendo oxazolidina como princípio ativo (MBO 100%) e a molécula dimorfolina (NBM 100%) mostraram-se mais eficazes no controle do crescimento e consequente formação de biomassa por todos os isolados.

Em um sistema de armazenamento real, podemos ter a presença de um biofilme já estabelecido na superfície dos tanques e na interface óleo/água, produtos de corrosão e outras substâncias (orgânicas e inorgânicas) decorrentes do crescimento microbiano, além de grupos microbianos distintos como bactérias aeróbias e anaeróbias e fungos filamentosos e leveduras.

Sendo assim, a utilização de produtos antimicrobianos deve apresentar a ação sobre diversos grupos microbianos (aeróbios e anaeróbios) além de diferentes níveis de contaminação microbiana possíveis de serem encontradas.

## 6. Conclusões

Os fungos *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium aurantiacum* e *Paecilomyces variotii* cresceram de acordo com o suporte mineral disponível nos meios mínimos. Nas condições de ensaio, foi possível detectar o consumo de fosfato do meio mineral pelos isolados, a produção de metabólitos ácidos pelos fungos e a formação de biomassa em todos os meios avaliados. O meio mínimo mineral Bushnell & Haas foi o meio selecionado nessa etapa.

Foi detectado, através de análises de CGMS, que, após 7 dias de contato entre fase oleosa/fase aquosa, houve a migração dos ésteres de cadeia carbônica palmitato de metila (C16), estearato de metila (C18), oleato de metila (C18:1), linoleato de metila (C18:2) e linolenato de metila C18:3 para a fase aquosa do experimento.

Os fungos filamentosos *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium aurantiacum* e *Paecilomyces variotii* foram capazes de crescer utilizando os biodieseis de linhaça, soja e oliva como fonte de carbono em seu metabolismo. Não foi observada nenhuma degradação das cadeias carbônicas dos ésteres do biodiesel pela técnica de cromatografia gasosa aos 60 e 120 dias.

As medidas de tensão superficial monitoradas durante o crescimento dos fungos em comparação com o controle indicam que não houve produção de biossurfactantes. Foram constatadas que as medidas de pH demonstraram uma pequena produção de metabólitos com caráter ácido ao final a curva de 120 dias.

O biocida com a molécula dimorfolina (NBM) apresentou, em 15 dias de avaliação, efeito esporo estático e esporicida sobre os fungos

*Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium aurantiacum* e *Paecilomyces variotii*, em condições laboratoriais e em baixas concentrações (0,5 g/L, 0,25 g/L e 0,5 g/L para a CMI, e 0,25 g/L, 0,125 g/L e 0,25 g/L para a CMB, respectivamente).

## **7. Perspectivas**

Realizar ensaios de cromatografia gasosa para avaliar a biodegradação dos ésteres presentes na fase aquosa, caracterizando as frações consumidas pelos micro-organismos.

Investigar metabólitos produzidos pelo metabolismo de micro-organismos através da técnica de microextração por fase sólida.

Detectar por técnicas moleculares os genes envolvidos na atividade das enzimas responsáveis pela degradação dos biodiesel, tais como lipase e esterase.

Avaliar a efetividade dos antimicrobianos em um sistema contendo uma fase aquosa e uma fase oleosa com os biodiesel testados, e verificar a suscetibilidade dos micro-organismos e possíveis interações no sistema.

## 8. Referências

ACOSTA-DÍAZ, S.; BARRIOS-SAN MARTÍN, Y.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, F.; ENRIQUE, J.; **Evaluación de antimicrobianos para su posible uso en depósitos de combustibles. Revista CENIC.** Ciencias Biológicas, vol. 42, núm. 3, pp. 119-123, septiembre-diciembre 2011.

ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed. 1 v., 2010.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M.; **Introductory Mycology.** 4 ed. John Wiley Sons. Inc. New York, 1996.

AMBROZIN, A.R.P.; KURI, S.E.; MONTEIRO, M.R.; **Corrosão Metálica Associada ao Uso de Combustíveis Minerais e Biocombustíveis.** Química Nova, 32, pp. 1910–1916, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **RESOLUÇÃO** N. 7, DE 19.03.2008.DOU 20.03.2008. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 01 out. 2012.

\_\_\_\_\_. **RESOLUÇÃO** ANP Nº 42, DE 16.12.2009 - DOU 17.12.2009 – RETIFICADA DOU 14.1.2010 Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 12.12.2012.

\_\_\_\_\_. **RESOLUÇÃO** CNPE Nº 6, DE 16.9.2009 - DOU 26.10.2009 Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 01 out. 2012.

\_\_\_\_\_. **RESOLUÇÃO** ANP Nº 4, DE 02.02.2010 - 3.2.2010 – RETIFICADA DOU 22.2.2010 Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 08 de janeiro de 2013.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO BRASILEIRO DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E **BIOCOMBUSTÍVEIS 2012.** MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, BRASIL. Disponível em: <.asp>. Acesso em janeiro de 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **RESOLUÇÃO** ANP Nº 14, DE 11.5.2012 - DOU 18.5.2012 Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 08.01.2013.

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.

APHA - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th edition. **American Public Health Association**, Washington, D.C, 1995.

ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T.; Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, 6(2), 141, 2007.

ARUN, A.; EYINI, M.; Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi. **Bioresource Technology**, 102, pp. 8063–8070, 2011.

ASTM E1259 - 10 Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390°C. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, DOI:10.1520/E1259-10, www.astm.org, 2010.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R.; Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. **The Benjamin/Cummings Publishing Co.**, Inc., 4 ed, 1996, 640p, 1998.

BACH, E. E.; RANGEL, A. R. Biodeterioração de tintas à base de água por fungos. **Exacta**, Volume 3, pp. 79-84, São Paulo, 2005.

BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ROSA, C. A.; STAMBUK, B. U.; Caracterização bioquímica e molecular de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de caldo de cana e melado para a produção de cachaça em Florianópolis-SC. **Brazilian Journal of Food Technology** Vol. 13 No. 1/4 pp. 205-213, 2010.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I.; Biorremediation os polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology**, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol**, 53: 495-508, 2000.

BARBOSA, L.S.; SARTORI, M.R.K.; Métodos de esterilização de artigos hospitalares efetivos contra micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba, 5: 136-153, 2012.

BASTIENS, L.; SPRINGAEL, D.; WATTIAU, P.; HARMS, H.; DEWACHTER, R.; VERACHTERT, H.; DIELS, L.; Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. **Appl. Environ. Microbiol.**, 66, pp. 1834–1843, 2000.

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.

BEECH, I.B.; GAYLARDE, C.C.; Recent advances in the study of biocorrosion – an overview. **Reviews Microbiology**, 30, pp. 177–190, 1999.

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.

\_\_\_\_\_. GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 47, n. 2, p. 107-112, 2001.

\_\_\_\_\_. ENGLERT, G. E.; GAYLARDE, C. C.; MULLER, I. L.; Micro-organismos e o armazenamento de óleo diesel. **Revista Petroquímica Petróleo, Gás & Química**, Rio de Janeiro, v. 211, p. 70-77, 1999.

\_\_\_\_\_. VISCARDI, S.L.C.; DARODA, R.; MENENDEZ, A.G.; CAMARGO, F.A.O.; GAYLARDE, C.C; 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.

\_\_\_\_\_. BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N.; CAVALCANTI, E.H.S.; ZIMMER, A.; GAYLARDE, C.C.; CAMARGO, F. A.O.; Impacto da adição de biodiesel ao óleo diesel durante a estocagem: um enfoque microbiológico e controle. **Revista Biodiesel** nº47, Caderno Técnico, Número 14, Julho 2010.

\_\_\_\_\_. BEECH, I.B.; GAYLARDE, C.C.; ENGLERT, G.E.; MULLER, I.L.; 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.

\_\_\_\_\_. CAMARGO, F.A.O.; GAYLARDE, C.C.; Biossurfactantes. In. Melo, I.S.; Azevedo, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.151-184, 2008.

\_\_\_\_\_. 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, D. M.; Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS. **Dissertação de Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande - RS, 2005.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C.; An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Appl Microbiol Biotechnol**, 90:1193–1206, 2011.

BIGATON, A.D.; Estruturas das comunidades e caracterizações metabólicas de leveduras em solos de Terra Preta Antropogênica. 2010. Dissertação (**Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente**) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BODOUR, A.A.; DREES, K.P.; MAIER, R.M.; Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3280–3287. Vol. 69, No. 6, June 2003.

BORNSCHEUER, U. T.; Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, 26, 73-81, 2002.

BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N.A.; ROESCH, L.F.; JACQUES, R.J.S.; PERALBA, M.C.R.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration and Biodegradation** 65:172–178, 2011.

BÜCKER, F. Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com antimicrobianos Porto Alegre: UFRGS, 2010, 146p. (**Dissertação de Mestrado**) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F.; The utilization of hydrocarbons by microorganisms. **J. Bacteriol.** 41:653–673, 1941.

CANDEIA, R. A.; SILVA, M. C. D.; CARVALHO FILHO, J. R.; BRASILINO, M. G. A.; BICUDO, T. C.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G.; Influence of soybean biodiesel content on basic properties of biodiesel–diesel blends. **Fuel**, 88(4), 738-743, 2009.

CARDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSONA, S.W.; ALVAREZ, E.; Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, 28, 145–154, 2001.

CARDOSO, E.R.; ASSIS, L.C; NAHAS, E.; Nutrition and growth of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.267-272, 2009.

CARNEIRO, R.A.F.; A Produção do Biodiesel na Bahia. **Conj. Planej.** 112, 35–43, 2003.

CARVALHO, D.S.; ZAMBIAZI, R.C.; Evaluation of the pilsen's beer fermentative process by using different concentrations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, Vol. 22, No 3, 2011.

CARVALHO, M. B.; MARTINS, I.; LEITÃO, M. C.; GARCIA, H.; RODRIGUES, C.; ROMÃO V.S.; MCLELLAN, I.; HURSTHOUSE, A.; PEREIRA, C.S.; Screening pentachlorophenol degradation ability by environmental fungal strains belonging to the phyla Ascomycota and Zygomycota. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 36, 1249–1256, 2009.

CAVALCANTI, E. H. S. Estabilidade do biodiesel e misturas. **Revista BiodieselBR**, Ano 3, Nº 13, p. 71-73, 2009.

CAZAROLLI, J. C.; BÜCKER, F.; MANIQUE, M. C.; KRAUSE, L. C.; MACIEL, G. P. DA S.; ONOREVOLI, B.; CARAMÃO, E. B.; CAVALCANTI, E. H. S.; SAMIOS, D.; PERALBA, M. DO C. R.; BENTO, F. M. Suscetibilidade do biodiesel de sebo bovino à biodegradação por *Pseudallescheria boydii*. **Revista Brasileira de Biociências** Vol. 10 No. 3 pp. 251-257, 2012.

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

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 some 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. **Internacional Joint Power Generation Conference**. Miami Beach. 2000.

CHUNG, Y. C.; CHEN, H. C.; SHYU, Y. T.; HUA, J.; 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 óleos diesel. In: **Seminário sobre qualidade e uso de combustíveis para veículos pesados**. Trabalhos técnicos, Rio de Janeiro, IBP, p. 154-159, 1994.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E.; Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, 20(2), 193-197, 2004.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M.; Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Appl. Environ. Microbiol.** 50:846–850, 1985.

CLAUSEN, M.; SCHMIDT, S.; Biodegradation of phenol and p-cresol by the hyphomycete *Scedosporium apiospermum*. **Research in microbiology**, 149(6), 399-406, 1998.

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

COIMBRA, M. D. J.; FIGUEIREDO, E. D. S.; SILVA, J. C. D.; BARRETO, A. J. B.; Seria o biodiesel o grande vilão formador da borra do óleo Diesel B? In: **5º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel / 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**. Salvador, Bahia, 2012.

COLAUTO, N. B.; AIZONO, P. M.; CARVALHO, L. R. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; LINDE, G. A.; Temperature and pH conditions for mycelial growth of *Agaricus brasiliensis* on axenic cultivation. **Semina: Cienc. Agrar**, 29(2), 307-312, 2008.

COSTA, A. E. Purificação de biodiesel com uso de adsorventes alternativos Florianópolis, UFSC, 2010 (**Tese de Doutorado**) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CURY, A.E.; PAULA, C.R.; MELHEM, M.S.C.; SILVA, M.R.R.; GIANNINI, M.J.S.M.; Testes de sensibilidade in vitro a antifúngicos. **Microbiologia in foco**, v.1, p.24-34, 2007.

DAS, N.; CHANDRAN, P.; Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, Índia, v.2011, p. 1-13, 2011.

DEMELLO, J.A.; CARMICHAEL, C.A.; PEACOCK, E.E.; NELSON, R.K.; AREY, J.S.; REDDY, C.M.; Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. **Mar Pollut Bull**, 54, pp. 894–904, 2007.

DEMIRBAS A. Biodiesel from sunflower oil in supercritical methanol with calcium oxide. **Energy Conversion and Management**, 48, pp. 937–941, 2007.  
DEMIRBAS A. Political, economic and environmental impacts of biofuels: a review. **Appl Energy**; 86: S108–17, 2009.

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.

DEVASAHAYAM, G.; SCHELD, W. M.; HOFFMAN, P. S.; Newer antibacterial drugs for a new century. **Expert Opin. Invest. Drugs** 19:215–234, 2010.

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

DIXIT, S.; KANAKRAJ, S.; REHMAN, A.; Linseed oil as a potential resource for bio-diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 16(7), 4415-4421, 2012.

DODOS, G. S.; KONSTANTAKOS, T.; LONGINOS, S.; ZANNIKOS, F.; Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. **Global Nest Journal**, 14(2), 175-182, 2012.

DOMINGOS, A.K.; SAAD, E.B.; VECHIATTO, W.W.D.; WILHELM, H.M.; RAMOS, L.P.; 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.

FASSINA, P. Avaliação da degradação do óleo de linhaça e da ação do seu efeito antioxidante através da incidência de radiação UV/Vis. Lajeado - Univates, 2011, 110p. **Dissertação Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Ambiente e Desenvolvimento, Univates, 2011.

FEIX, R. D. A indústria do biodiesel no Rio Grande do Sul: desafios e oportunidades. **Indic. Econ. FEE**, Porto Alegre, v. 39, n. 4, p. 145-158, 2012.  
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.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A.; Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, 28, pp. 19–23, 2005.

FONSECA, M.M.; YOSHIDA, M.I.; Thermal analysis of raw and aged linseed oil. **Vértices**, Campos dos Goytacazes/RJ, v. 11, n. 1/3, p. 61-75, jan./dez. 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.

FRANÇA, F. P., VIEIRA, D.M.; CAVALCANTI, E.; Biodegradation of soy biodiesel by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pichia guilliermondii*. **Canadian Journal of Pure and Applied Sciences**, 5(1): 1355-1361, 2011.

FREGOLENTE, P. B. L.; FREGOLENTE, L. V.; WOLF MACIEL, M. R.; Water Content in Biodiesel, Diesel, and Biodiesel–Diesel Blends. **Journal of Chemical & Engineering Data**, 57(6), 1817-1821, 2012.

FREITAS, J.G.; ALBUQUERQUE, F.A.; NÓBREGA, M.B.M.; MILANI, M.; Análise da mamoneira na microrregião de Irecê-BA. In: *Inclusão Social e Energia*, 7-10 de junho. Anais... p. 1151-1156. **Embrapa Algodão**, 2010.

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

FUKASAWA, Y.; OSONO, T.; TAKEDA, H.; Effects of attack of saprobic fungi on twig litter decomposition by endophytic fungi. **Ecological Research**, 24(5), 1067-1073, 2009.

FUNHOFF, E. G.; VAN BEILEN, J. B. Alkane activation by P450 oxygenases. **Biocat Biotrans**, v. 25, n. 2 - 4, p. 186 - 193, 2007.

GALVÃO, E. L.; SILVA, D.C.F; SILVA, J.O.; MOREIRA, A.V.B.; SOUSA, E.M.B.D. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica de óleo de linhaça. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 28, n. 3, p. 551-557, 2008.

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.

\_\_\_\_\_. Design, 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.

GIANCOLI, D. C.; Physics, principles with applications. Second edition. **Prentice-Hall**, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, 1985.

GOMES, G.; VILLELA, A.; MACIEL, J.; CARVALHO, I.; SILVA, P.; SOUSA, M.F.; Estudo comparativo da degradação de querosene por *Trichosporon pullulanse* *Rhodotorula aurantiaca*. In: **Anais IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão - JEPEX**, Recife, 2009.

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 micro-organismos sésseis. In: Congresso Brasileiro de Corrosão, 22, 2002. **Conferência sobre Tecnologia de Equipamentos**, 6, Salvador. São Paulo: Monterrer Produções Gráficas e Digitais, v. 1. p. 1-12, 2002.

GRABOSKI, M. S.; MCCORMICK, R. L.; Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. **Progress in Energy and Combustion Science**, 24(2), 125-164, 1998.

GRIEBELER, N.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; CECHET, J. L.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.;

CANSIAN, R.L.; RIGO, E.; NINOW, J.L.; Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity. **Food Bioprocess Technol**, 4:578–586, 2011.

GROOT, A.; GEIER, J.; FLYVHOLM, M.A.; LENSEN, G.; COENRAADS, P.J.; Formaldehyde-releasers: relationship to formaldehyde contact allergy. Metalworking fluids and remainder. Part 1. **Contact Dermatitis** 2010: 63: 117–128.

GUEDES, S. F. Estudo da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um herbicida selectivo amplamente utilizado na agricultura, por uma estirpe de *Penicillium*. (**Dissertação de Mestrado**) Universidade Nova de Lisboa, Grupo de Disciplinas de Ecologia e Hidrosfera, Portugal, 2010.

GUTARRA, M. L.; GODOY, M. G.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M.; Inoculum strategies for *penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 82(3), 313-318, 2007.

GUTHEIL, N.G.; Ocorrência de *Cladosporium resinae* (Lindau) de Vries em querosene de aviação no Brasil. **Boletim No. 9, Instituto Tecnológico do RS**, Porto Alegre, 1966.

GUZATTO, R.; DE MARTINI, T. L.; SAMIOS, D.; The use of a modified TDSP for biodiesel production from soybean, linseed and waste cooking oil. **Fuel Processing Technology**, 92(10), 2083-2088, 2011.

HAMAMURA, N.; FUKUI, M.; WARD, D.M.; INSKEEP, W.P.; Assessing Soil Microbial Populations Responding to Crude-Oil Amendment at Different Temperatures Using Phylogenetic, Functional Gene (*alkB*) and Physiological Analyses. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 7580–7586, 2008.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P.; Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Journal of Hazardous Materials**, 169(1), 1-15, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A.; Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235 – 251, 2006.

HENCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; DOMINGOS, R.N.; GONÇALVES, R.A.; SEABRA, P.N.; LA SCALA, N.; Avaliação da biodegradação de resíduos de hidrocarbonetos no solo de "landfarming" utilizando espectroscopia de absorção ótica no infravermelho. In: **4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás**, Campinas, SP 21-24 de Outubro de 2007.

HETTIGE, G. E.; SHERIDAN, J. E.; Interactions of fungi contaminating diesel fuel. **International Biodeterioration**, 25(4), 299-309, 1989.

HILL, E.C.; HILL, G.C.; Microbial Contamination and Associated Corrosion in Fuels, During Storage, Distribution and Use. **Advanced Materials Research**, v. 38:257 - 268, 2008.

\_\_\_\_\_. Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesels. . In: **IASH 2009, the 11th International Conference on Stability, handling and use of liquid fuels**, Tucson, USA October 18 - 22, 2009.

\_\_\_\_\_. Today's Fuels - **Bio Friendly for Man** - and for microbes. ECHA Microbiology LTD, Cardiff, Downstream Autumn 2008. Disponível em [www.echamicrobiology.co.uk](http://www.echamicrobiology.co.uk), acesso em 10/01/2013.

HÖFLING, J. F.; Gonçalves, R. B.; **Microscopia de luz em microbiologia: Morfologia bacteriana e fúngica**. Artmed Editora, 2008.

ISHII, K.; FURUICHI, T.; Development of **bioreactor system for treatment** of dioxin-contaminated soil using *Pseudallescheria boydii*. J. Hazard. Mater., 148 (3), pp. 693–700, 2007.

JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.O.; Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.1192-1201, jul-ago, 2007.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T.; Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol.** 53, 315-351, 1999.

JANDA-ULFIG, K.; ULFIG, K.; CANO, J.; GUARRO, J.; A study of the growth of *Pseudallescheria boydii* isolates from sewage sludge and clinical sources on tributyrin, rapeseed oil, biodiesel oil and diesel oil. **Ann Agric Environ Med** 15, 45–49, 2008.

JONATHAN, S. G.; FASIDI, I. O.; Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atrombonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. **Food chemistry**, 72(4), 479-483, 2001.

KACZOREK, E.; JESIONOWSKI, T.; GIEC, A.; OLSZANOWSKI, A.; Cell surface properties of *Pseudomonas stutzeri* in the process of diesel oil biodegradation. **Biotechnology letters**, 1-6, 2012.

KAUFMANN, D.D.; KEARNEY, P.C.; Microbial Degradation of Isopropyl-N-3-Chlorophenylcarbamate and 2-Chloroethyl-N-3-Chlorophenylcarbamate. **Applied Microbiology**. Vol. 13, No. 3 Printed in U.S.A, May, 1965.

KAVANAGH, K.; Fungi. Biology and Applications. 2ª Edição, **John Wiley and Sons**, Ltd., 377 p., 2011.

KENNES, C.; VEIGA, M. C.; Biodegradation of Mono-Aromatic Hydrocarbons by Fungi. **Microbial Degradation of Xenobiotics**, 177-188, 2012.

AL - KHUDARY, R.; HASHWA, F.; MROUEH, M.; A novel olive oil degrading *Thermoactinomyces* species with a high extremely thermostable lipase activity. **Engineering in Life Sciences**, 4(1), 78-82, 2004.

KHOURY, R. R.; EBRAHIMI, D.; HEJAZI, L.; BUCKNALL, M. P.; PICKFORD, R.; BRYNN HIBBERT, D.; Degradation of fatty acid methyl esters in biodiesels exposed to sunlight and seawater. **Fuel**, 90(8), 2677-2683, 2011.

KIM, H. S., KIM, S. B., PARK, S. H., OH, H. M., PARK, Y. I., KIM, C. K.; KATSURAGI, T.; TANI, Y.; YOON, B. D.; Expression of sfp gene and hydrocarbon degradation by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters** 22: 1431–1436, 2000.

KLINKSPON, N. Impact of biodeterioration in diesel fuel systems. In: **IASH 2009, the 11th Internacional Conference on Stability, handling and use of liquid fuels** Tucson, USA October 18 - 22, 2009.

KNOTHE, G.; DUNN, R.O.; Dependence of Oil Stability Index of Fatty Compounds on Their Structure and Concentration and Presence of Metals. **Journal of the American Oil Chemists' Society** 80, 1021–1026, October 2003.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. Manual de Biodiesel, Ed. **Edgard Blucher**: São Paulo, 2006.

KNOTHE G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Process. Technol.** 88: 669–677; 2007.

KRAUSE, L. C. Desenvolvimento do processo de produção de biodiesel de origem animal Porto Alegre: UFRGS, 2008, 147p. (**Tese de Doutorado**) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

LAZZARI, M.; CHIANTORE, O.; Drying and oxidative degradation of linseed oil. **Polym. Degrad. Stab.**, 65, pp. 303–313, 1999.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M.; Lehninger: Princípios de Bioquímica, 5a. Edição, Editora **Artmed**, 2011.

LEITE, R.C.C.; LEAL, M.R.L.V. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos CEBRAP**, 78, pp. 15–21, 2007.

LEUNG, D.Y.C.; WU, X.; LEUNG, M.K.H.; A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, 87, pp. 1083–1095, 2010.

\_\_\_\_\_. 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.; MAY, C. Y.; FOON, C. S.; NGAN, M. A.; HOCK, C. C.; BASIRON, Y.; The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. **Fuel**, 85(5), 867-870, 2006.

LIN, J.; BALLIM, R.; Biocorrosion control: Current strategies and promising alternatives. **African Journal of Biotechnology** Vol. 11(91), pp. 15736-15747, 13 November, 2012.

LITTLE, B. J.; RAY, R. I.; LEE, J. S.; Diagnosing, Measuring, and Monitoring Microbiologically Influenced Corrosion. In **Uhlig's Corrosion Handbook**, Third Edition (ed R. W. Revie), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2011.

LÔBO, I.P.; FERREIRA, S.L.C.; CRUZ, R.S. DA; Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Quim. Nova**, 32, pp. 1596–1608, 2009.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E. R.; NÍVEA DE F FIGUEIREDO, N. D. F. F.; DA S GODINHO, P.; ABRÃO, R. L.; A particularidade de ser um fungo—I. Constituintes celulares. **Biotemas**, 19(2), 17-27, 2006.

LOPES, D. B.; FRAGA, L. P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A.; Lipase and esterase – to what extent can this classification be applied accurately? **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 31 (3), 608-613, 2011.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; ABIAN, O.; GUISÁN, J.M.; Altering the Interfacial Activation Mechanism of a Lipase by Solid-Phase Selective Chemical Modification. **Biochemistry**, 51, 7028–7036, 2012.

LORO, M.; JIMÉNEZ, C.A.V.; NOZAWA, S.; MÁRQUEZ, L.M.; Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. **Journal of Arid Environments** Volume 85, Pages 46–55, October 2012.

LUZ, J.M.A.; LIMA, R.M.F.; Tratamento de Minérios: Práticas Laboratoriais Parte VIII – Medições em Laboratório. **Centro de Tecnologia Mineral Ministério da Ciência e Tecnologia Capítulo 27** – pág. 473, 2007.

LUZ, C.C.; SANTOS, E.A.; SANTOS, M.O.S.; MUSSY, M.Y.; YAMASHITA, M.; BASTOS, W.R.; BRICHA, G.; REIS, M.M.; REIS, M.G.; Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho - RO, Amazônia. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 5, 775-779, 2011.

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. 2012.

MACIEL, C.C.S.; SOUZA, M.A.; GUSMÃO, N.B.; TAKAKI, G.M.C.; **Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados**. *Exacta*, vol. 8, núm. 3, pp. 299-305, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: **ArtMed**, 2010.

MAGAN, N.; Fungi in extreme environments. D.T. Wicklow, B. Soderstrom (Eds.), **The Mycota IV, Environmental and Microbial Relationships**, Springer-Verlag, Berlin, 1997.

MAIA, R. R. D. S. Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB): implicações de uma análise custo benefício. **Mestrado em Gestão Econômica do Meio Ambiente** - Programa de Pós-Graduação do Departamento de Economia da Universidade de Brasília (UnB), 2013.

MAIER, R.M.; SOBERON-CHAVEZ, G.; Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications **Applied Microbiology and Biotechnology**, 54, pp. 625–633, 2000.

MALIK, Z. A.; AHMED, S.; Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. **African Journal of Biotechnology** Vol. 11(3), pp. 650-658, 10 January, 2012.

MARANGONI, P.R.D. Caracterização de biofilmes formados em superfícies metálicas e biocorrosão. **Dissertação de Mestrado**, Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2010.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M.; Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology** Volume 30, Issue 11,, Pages 558–565, November 2012.

MAREK, A.; BEDNARSKI, W.; Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. **Biotechnology Letters**, 18(10), 1155-1160, 1996.

MARIANO, A.P.; TOMASELLA, R.C.; OLIVEIRA, L.M.; CONTIERO, J.; ANGELIS, D.F.; Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **Afr J. Biotechnol.** 7:1323, 2008.

MARZZOCO, A.; BAYARDO, B.; *Bioquímica Básica*, 3ª edição - **Editora Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 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.

MELLO, R. A. Produção do bioaroma acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii* CCT3800 através do processo fermentativo batelada alimentada. Florianópolis, UFSC, 2001 (**Tese de Doutorado**) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

MENDES, A. P. A.; COSTA, R. C.; Mercado brasileiro de biodiesel e perspectivas futuras. **BNDES Setorial** 31: Biocombustíveis. p. 253-280, 2010.

MENEGHETTI, S. P.; MENEGHETTI, M. R.; BRITO, Y. C.; A Reação de Transesterificação, Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel. *Revista Virtual de Química*, 2013.

MEYER, D.D. Avaliação da biodegradabilidade das misturas de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias. 2010. 161p. Dissertação (**Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente**). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MIRANDA, R.C.; SOUZA, C.S.; GOMES, E.B.; LOVAGLIO, R.B.; LOPES, C.E.; SOUSA, M.F.; Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 50, pp. 147–152, 2007.

MOHANASRINIVASAN, V.; DHRISSA, P.; DIPINSHA, K. P.; MANU UNNITHAN, C.; MEGHA VISWANATH, K.; SUBATHRA DEVI, C.; A comparative study of the lipase yield by solid state and submerged fermentations using fungal species from biopharmaceutical oil waste. **African Journal of Biotechnology** Vol. 8 (1), pp. 073-076, 5 January, 2009.

MOORE-LANDECKER, E.; *Fundamentals of the Fungi*. 4th ed. **Prentice Hall**, New Jersey, USA, 574pp, 1996.

MORENTE, E. O.; FERNÁNDEZ-FUENTES, M. A.; GRANDE BURGOS, M. J.; ABRIOUEL, H.; PÉREZ PULIDO, R.; GÁLVEZ, A.; Biocide tolerance in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 162(1), 13-25, 2013.

MUKHTAR, T. A.; WRIGHT, G. D.; Streptogramins, oxazolidinones, and other inhibitors of bacterial protein synthesis. **Chem. Rev.** 105:529–542, 2005.

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

MURUGESAN, A.; UMARANIB, C.; SUBRAMANIAN, R.; NEDUNCHEZHIAN, N.; 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.

MYERS, F.; Biocidal agents: modes of action and correlation with antibiotic resistance. **Biomedical Scientist**, Vol 52; Numb 3, pages 227-231, 2008.

NAKANO, M.M.; CORBELL, N.; BESSON, J.; ZUBER, P.; Isolation and characterization of sfp: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. **Mol Gen Genet**, 232:313-321, 1992.

NGUYEN, L. N.; DAO, T. T.; ŽIVKOVIĆ, T.; FEHRHOLZ, M.; SCHÄFER, W.; SALOMON, S.; Enzymatic properties and expression patterns of five extracellular lipases of *Fusarium graminearum* in vitro. **Enzyme and Microbial Technology**, 46, 479–486, 2010.

NICOLAU, A. Polímero Obtidos a partir do ácido oleico: obtenção e caracterização físico-química no estado sólido e em solução. 2009. 113 f. Tese (**Doutorado em Química**) – Faculdade de Química, UFRGS, Porto Alegre, 2009.

NITSCH, M. O programa de biocombustíveis Proalcool no contexto da estratégia energética brasileira. **Revista de Economia Política**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 123-138, abr./jun. 1991.

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

NUERNBERG, K.; FISCHER, K.; NUERNBERG, G.; KRUECHENMEISTER, U.; KLOSOWASKA, D.; ELIMINOWSKA-WENDA, G.; Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. **Meat Science**, 70, pp. 63–74, 2005.

OBERMAIER, M.; LA ROVERE, E. L.; Vulnerabilidade e resiliência socioambiental no contexto da mudança climática: o caso do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB). **Parcerias Estratégicas**, 16(33), 109-134, 2012.

OGUNBAYO, A. O.; BELLO, R. A.; NWAGBARA, U.; Bioremediation of Engine Oil Contaminated Site. **Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences (JETEAS)**, 3(3), 483-489, 2012.

OLIVEIRA, F. C. C.; SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, W. L. P.; “Biodiesel: possibilidades e desafios,” **Química Nova na Escola**, vol. 28, pp. 3–8, 2008.  
OLIVEIRA, D. M. Biodegradação de Biodiesel de Origem Animal. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brasil, 2008.

ONWOSI, C.O.; ODIBO, F.J.C.; Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. **World J Microbiol Biotechnol**, 28:937–942, 2012.

PAGLIUCA, M. M.; SCARPATO, D.; Food quality, consumer perception and preferences: na analysis on olive oil. **Electron. J. App. Stat. Anal.**, Vol. 4, Issue 2, 215 – 226, 2011.

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

PARENTE, E. J. S. BIODIESEL: **Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado**. Fortaleza: 2003. Disponível em: < <http://www.xitizap.com/Livro-Biodiesel.pdf> > Acesso em: 16 set. 2012.

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

PASSMAN, F.; DOBRANICK, J.K.; Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: **IX Internacional Conference in Stability, Handling, and Use of Liquid Fuels**, 2005. Espanha, Setembro, p.18-22, 2005.

PASSMAN, F. New guides for diagnosing and controlling microbial contamination in fuel and fuel systems. In: **VII Internacional Conference in Stability, Handling, and Use of Liquid Fuels**, 2000. Espanha. Setembro, p.24-29, 2000.

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

\_\_\_\_\_. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980—a review. **International Biodeterioration & Biodegradation** – In Press, 1 – 17, 2013.

PAZMIÑO, D.E.T.; WINKLER, M.; GLIEDER, A.; FRAAIJE, M.W.; Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. **Journal of Biotechnology**, v. 146, p. 9–24, 2010.

PIMENTEL, D.; PATZEK, T. W.; Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. **Natural Resources Research**, Volume 14, Issue 1, pp 65-76, March 2005.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; KUHN, A.; LUYKX, D. M.; ANKE, H.; VAN GROENESTIJN, J. W.; BONT, J. A.; Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. **Mycological research**, 105(4), 477-484, 2001.

PRINCE, R.C.; MCFARLIN, K.M.; BUTLER, J.D.; FEBBO, E.J.; WANG, F.C.Y.; NEDWE, T.J.; The primary biodegradation of dispersed crude oil in the sea. **Chemosphere**, 90, 521–526, 2013.

QUADROS, D. P.; CHAVES, E. S.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, L. S.; CURTIUS, A. J.; PEREIRA, P. A.; Contaminantes em Biodiesel e Controle de Qualidade. **Revista Virtual de Química**, 3(5), 376-384, 2011.

RAIKOS, V.; VAMVAKAS, S. S.; SEVASTOS, D.; KAPOLOS, J.; KARAIKAKIS, G.; KOLIADIMA, A.; Water content, temperature and biocide effects on the growth kinetics of bacteria isolated from JP-8 aviation fuel storage tanks. **Fuel**, 93, 559–566, 2012.

RAJASEKAR, A.; MARUTHAMUTHU, S.; TING, Y. P.; BALASUBRAMANIAN, R.; RAHMAN, P. K.; Bacterial degradation of petroleum hydrocarbons. **Microbial Degradation of Xenobiotics**, 339-369, 2012.

RAMOS, Y.; ALONSO, G.; Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes de bacterias aisladas de ambientes naturales. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, 31(2), 130-137, 2012.

RAMOS, L.P.; KUCEK, K.; DOMINGOS, A.K.; WILHEM, H.M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, 31, pp. 28–37, 2003.

RAPP, P.; BACKHAUS, S.; Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. **Enzy. Microbiol. Technol.**, 14, pp. 938–943, 1992.

REGINATTO, C.; COLLA, L.M.; THOMÉ, A.; Biorremediação de Resíduos Oleosos. **Revista CIATEC – UPF**, vol.3 (2), p.p.19-31, 2011.

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.

ROBERTSON, B. K.; ALEXANDER, M.; Influence of calcium, iron, and pH on phosphate availability for microbial mineralization of organic chemicals. **Applied and Environmental Microbiology**, 58(1), 38-41, 1992.

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.

RUTALA, W.A.R.; WEBER, D.J.; The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC); Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. Atlanta, GA: **Center for Disease Control and Prevention**. 2008.

SÁ, T. N. M. (2011). Produção de ácido cítrico utilizando glicerol residual da produção de biodiesel como substrato. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia. Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2011.

SANTOS, M. A. Inserção do biodiesel na matriz energética brasileira: aspectos técnicos e ambientais relacionados ao seu uso em motores de combustão. (**Dissertação de Mestrado** – Programa Interunidades de Pós-Graduação em Energia). EP/ FEA/ IEE/ IF da Universidade de São Paulo – USP, 2007.

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](http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamentoll.htm)> Acesso em: 22 novembro, 2012.

SANTOS, M. M. Caracterização bioquímica de uma esterase halofílica de *Haloarcula marismortui*. Universidade Federal do Paraná, (**Tese de Doutorado**) Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, UFP, 2009.

SARUBBO, L.A.; FARIAS, C.B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; Co-Utilization of Canola Oil and Glucose on the Production of a Surfactant by *Candida lipolytica*. **Current Microbiology** Vol. 54, pp. 68–73, 2007.

SCHLEICHER, T.; WERKMEISTER, R.; RUSS, W.; MEYER-PITTROFF, R.; Microbiological stability of biodiesel - diesel mixtures. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, n.2, p.724-730, 2009.

SCHULTZ, L. C. Avaliação de micro-organismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel Porto Alegre: UFRGS, 2010, 137p. (**Dissertação de Mestrado**) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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.

SHUTTLEWORTH, K.L.; CERNIGLIA, C.E.; Practical methods for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading microorganisms and biodegradation intermediates. In: Hurst, J., Knudsen, G.R., Mcinerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V. (Eds.), **Manual of Environmental Microbiology**. ASM, Washington, pp. 766– 775, 1996.

SIEGERT, W. Microbial contamination in diesel fuel - are new problems arising from biodiesel blends? In: **IASH 2009, the 11th Internacional Conference on Stability, handling and use of liquid fuels** Tucson, USA October 18 - 22, 2009.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A.; Métodos para Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante. **Química Nova**, 22:94, 1999.

SILVA, G.S.; MARQUES, E.L.S.; DIAS, J.C.T.; LOBO, I.P.; GROSS, E.; BRENDDEL, M.; CRUZ, R.S.; REZENDE, R.P.; Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. **Applied Soil Ecology**, Volume 55, Pages 27–35, April 2012.

SIMONS, K.L.; ANSAR, A.; KADALI, K.; BUETI, A.; ADETUTU, E.M.; BALL, A.S.; Investigating the effectiveness of economically sustainable carrier materia complexes for marine oil remediation. **Bioresource Technology**, 126, 202–207, 2012.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M.; Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1-35, 2012.

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

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

SMITH, R.N.; Developments in fuel microbiology. In: **International Biodeterioration and Biodegradation Symposium**, 8., 1991, London. London: Elsevier, p. 112-124, 1991.

SORENSEN, G.; PEDERSEN, D.V.; NORGAARD, A.K.; SORENSEN, K.B.; NYGAARD, S.D.; Microbial growth studies in biodiesel blends. **Bioresource Technology** 102, 5259–5264, 2011.

SOUZA, M.M. Biodegradação de Misturas de diesel e Biodiesel por microorganismos de água portuária. **Dissertação 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, 2012.

STENERSEN, J.; Chemical pesticides mode of action and toxicology. CRC. ISBN 0-7484-0910-6 **Library of Congress Cataloging-in-Publication Data**, 2004.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R.; Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Quim. Nova**, 30, 667, 2007.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B.; Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Quim. Nova**, 32, 768, 2009.

SUZUKI, Y.; MIYAMOTO, K.; OHTA, H.; A novel thermostable esterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7, **FEMS Microbiology Letters**, v.236, p.97-102, 2004.

YI, T.; LEE, E. H.; PARK, H.; CHO, K. S.; Biodegradation of petroleum hydrocarbons by *Neosartorya* sp. BL4, **Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, 46:14, 1763-1768, 2011.

TEIXEIRA, G.A.A.; QUEIROZ, N., SOUZA, A. L.; GARCIA, I. M.; MAIA, A. S.; SOUZA, A. G. Avaliação dos parâmetros de qualidade para o biodiesel metílico obtido de misturas de óleos vegetais e gordura animal durante armazenamento. **4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Anais, Volume 03; p:1287-1288, 2010.

TIGINI, V.; PRIGIONE, V.; DI TORO, S.; FAVA, F.; VARESE, G. C.; Isolation and characterisation of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil. **Microbial Cell Factories**, 8(1), 5, 2009.

TORRES GARCÍA, C. E.; Control microbiológico en la industria papelera (**Doctoral dissertation**). Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 2013.

TORTORA, GERARD J.; FUNNKE, BERDELL R.; CASE, CHRISTIANE L.; Microbiologia 10ª Edição, **Editora Artmed**, 2011.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.. (Org.). Microbiologia. 5ed. Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 2008.

VAKHLU, J.; KOUR, A.; Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electron J Biotechnol**, 9:69–85, 2006.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P.; Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** vol. 67 no. 4 503-549, December 2003.

VERGER, R.; "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. **Trends Biotechnol.** 15, 32-38, 1997.

VIEIRA, J.A.V.; PORTILHO, B.D.; LIMA, M.S.; Remoção e Reabsorção de Água em Biodiesel de Mamona & Soja. In: **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, 2007, Brasília. Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007. Disponível em: <[http://www.biodiesel.gov.br/rede\\_arquivos/armazenamentoll.htm](http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamentoll.htm)> Acesso em: 30 de agosto de 2012.

VIEIRA, T.; LIMA, M.F.; PEIXOTO, R.M.; VIEIRA, J.D.G.; Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: **Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Brasília, 2006. Disponível em: <[http://www.biodiesel.gov.br/rede\\_arquivos/armazenamento.html](http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamento.html)> Acesso em: 30 de agosto de 2012.

WACKER, A.; VON ELERT, E.; Polyunsaturated fatty acids: evidence for non-substitutable biochemical resources in *Daphnia galeata*. **Ecology** 82: 2507–2520, 2001.

WANG, H.; XU, R.; LI, F.; QIAO, L.; ZHANG, B.; Efficient degradation of lube oil by a mixed bacterial consortium. **Journal of Environmental Sciences**, v.22, n.3, p.381–388, 2010.

WHITLELEY, C.G.; BURGESS, J.E.; MELAMANE, X.; PLETSCHKE, B.; ROSE, P.D.; The enzymology of sludge solubilisation utilising sulphate-reducing systems: the properties of lipases. **Water Research**, v.37, p.289-296, 2003.

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.

YANG, Y. H.; BRIGHAM, C. J.; BUDDE, C. F.; BOCCAZZI, P.; WILLIS, L. B.; HASSAN, M. A.; YUSOF, Z.A.M.; RHA, C.; SINSKEY, A. J.; Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 87(6), 2037-2045, 2010.

YASSINE, M. H.; WU, S.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D.; Partitioning behavior of petrodiesel/biodiesel blends in water. **Environmental Science & Technology**, 46(14), 7487-7494, 2012.

YEMANSHOVA , N. A.; MURYGINA, V. P.; ZHUKOV, D. V.; ZAKHARYANTZ, A. A.; GLADCHENKO, M. A.; APPANNA, V.; KALYUZHNYI, S. V.; 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.

YUSTE, L.; CORBELLA, M. E.; TURIÉGANO, M. J.; KARLSON, U.; PUYET, A.; ROJO, F.; Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. **FEMS Microbiology Ecology**, 32(1), 69-75, 2006.

ZHANG, X.; PETERSON, C.L.; REECE, D.; MBLER, G.; HAWS, R.; Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of American Society of Agricultural Engineers**, St. Joseph, v. 41, p. 1423-1430, 1998.

ZHANG, Q.; SHI, F.; GU, Y.; YANG, J.; DENG, Y. 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.

ZIMMER, A. ; CAZAROLLI, J.C. ; TEIXEIRA, R. M. ; VISCARDI S.L.C. ; CAVALCANTI, E.S.H. ; GERBASE, A ; FERRÃO, F.M. ; PIATNICK, C.M.S. ; BENTO, F. M. Monitoring of efficacy of biocides during storgae simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). In: **IASH 2011, the 12th Internacional Conference on Stability, handling and use of liquid fuels, 2011**, Sarasota, Florida USA.

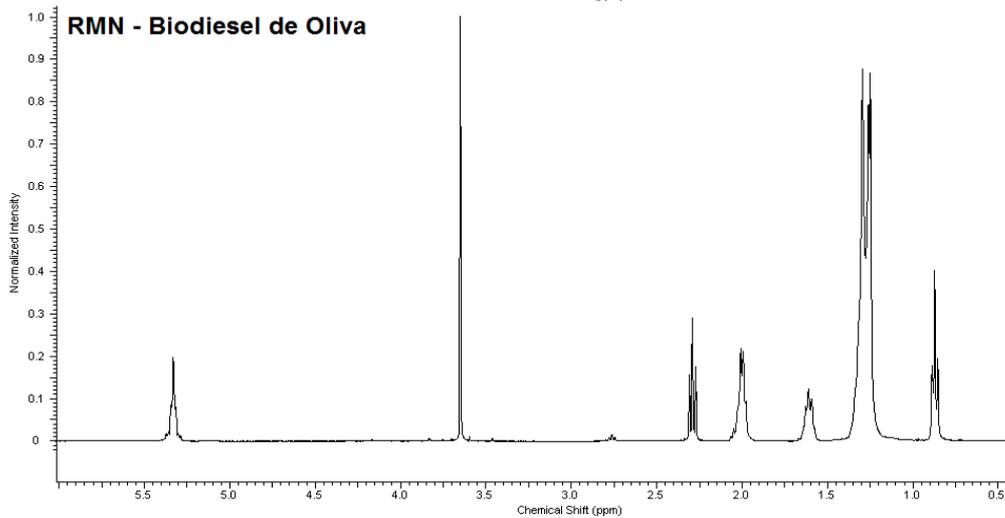
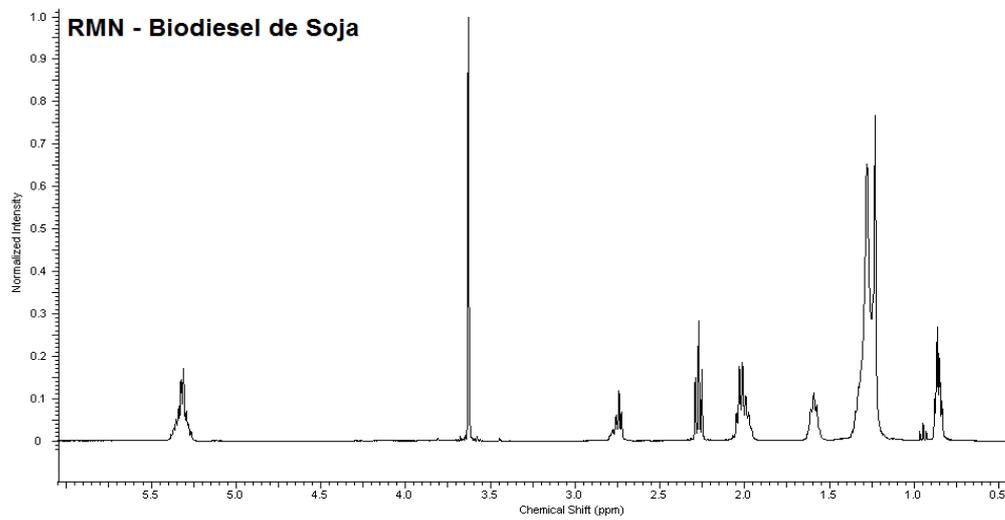
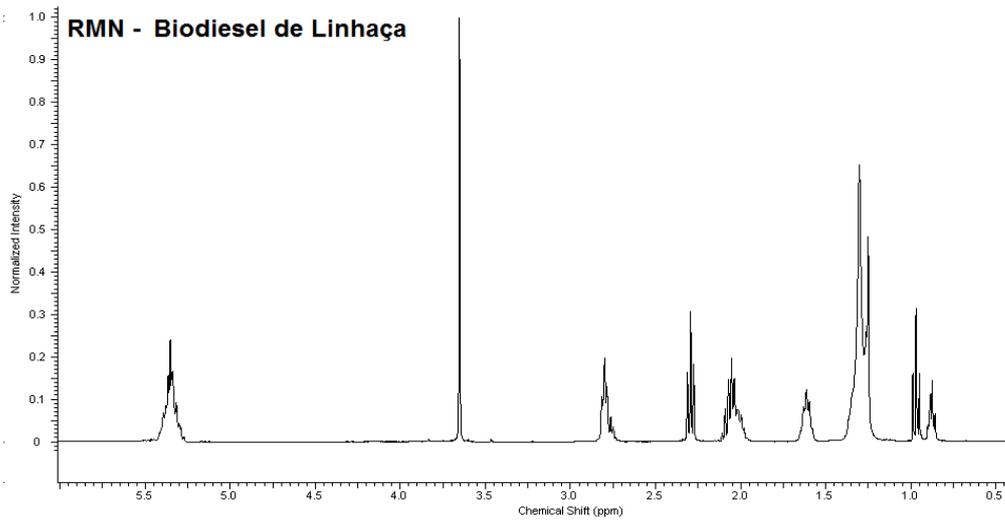
ZUNIGA, A.D.; PAULA, M.M.; COIMBRA, J.S.R.; MARTINS, E.C.A.; SILVA, D.X.; TELIS-ROMERO, J.; Revisão: propriedades físico-químicas do biodiesel. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, ISSN 0103-7277, Vol. 21, pp. 55-72, 2011.

## **9 Apêndice I**

### **9.1 Ressonância Magnética Nuclear**

De acordo com a Resolução ANP N<sup>o</sup> 14, de 2012 da Agência Nacional de Petróleo (ANP, 2012), o biodiesel só pode ser comercializado se apresentar mais de 96,5% de ésteres na composição. Para isso os biodieseis produzidos foram analisados através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (<sup>1</sup>H RMN), em um Espectrômetro da marca Bruker 400 MHz. Aproximadamente 10 – 15 mg de amostra de biodiesel foi solubilizada em Clorofórmio Deuterado (CDCl<sub>3</sub>) – 0.5 mL. Como referência interna foi usado Tetrametilsilano (TMS) (marcação do deslocamento químico zero). O tempo de relaxação (tempo entre pulsos) foi de 10 segundos, para permitir a quantificação de todos os hidrogênios da molécula.

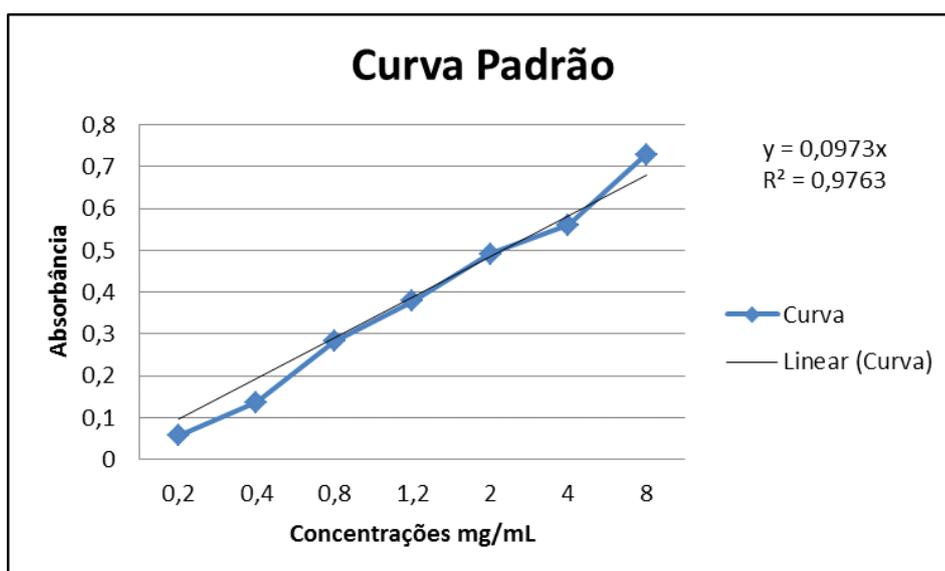
Desta forma, após a produção foram detectados para o Biodiesel de Linhaça 97,7%, para o Biodiesel de Soja 98,3%, para o Biodiesel de Oliva 98,3% de ésteres totais.



Espectros de RMN dos Biodieseis de Linhaça, Soja e Oliva, testados nesse trabalho.

## 10. Apêndice II

Plota-se a resposta de absorvância da curva de calibração versus concentração. Adicionar a equação mais ajustada do gráfico, juntamente com o valor de  $R^2$ , e através dela, calcula-se a concentração da substância desejada nas amostras, como demonstra o exemplo abaixo.



Cálculo:  $y=0,0973x$ , com  $R^2=0,97$ .

X = concentração amostra

Y = absorvância amostra

Então, Concentração = (Absorbância)/0,0973

## 11. Anexo I

### 11.1 Formulações dos Meios Mínimos

<i>Reagentes MM1</i>	<i>Richard &amp; Vogel g/L</i>
Macronutrientes	
KCl	0,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1
Micronutrientes	
1ml/L	
MgSO <sub>4</sub> *	4
FeSO <sub>4</sub> *	0,2
MnCl <sub>2</sub> *	0,2
CaCl <sub>2</sub> *	0,2

- pH 7,0

<i>Reagentes MM2</i>	<i>Tanner g/L</i>
KCl	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1
NaCl	0,8
NH <sub>4</sub> Cl	1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,04
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ).6H <sub>2</sub> O	0,8
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	0,02

- pH 7,0

<i>Reagentes MM3</i>	<i>Bushnell &amp; Haas g/L</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub>	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,02
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
FeCl <sub>3</sub>	0,05
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1

- pH 7,0

<i>Reagentes MM4</i>	<i>Kaufmann &amp; Kearney g/L</i>
MgSO <sub>4</sub>	0,2
CaSO <sub>4</sub>	0,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>24</sub>	0,001

- pH 7,0

## **12. Curriculum Vitae**

### **12.1 Identificação**

Nome: Juciana Clarice Cazarolli

Filiação: José Luis Cazarolli e Eliria Maria Facco Cazarolli

Data de Nascimento: 19/11/1986      Sexo: feminino

Naturalidade: Frederico Westphalen      Estado: RS

E-mail: jucianacazarolli@gmail.com

### **12.2 Histórico Escolar**

Ensino Médio – Escola: Escola Estadual Técnica José Cañellas. Cidade: Frederico Westphalen – RS. Período: 2002 – 2004

Ensino Superior – Faculdade: Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Curso: Ciências Biológicas. Cidade: Porto Alegre – RS. Período: 2006 – 2010

Pós – Graduação – Mestrado no Programa de pós Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Período: 2011 – 2012.