

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Nº 58

P

P

G

E

Q

PPEQ - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química. CEP. 50740-
521 – Cidade Universitária- Recife –
PE.
Telefax: 0-xx-81- 21267289



TESE DE DOUTORADO

**BIO E FOTODEGRADAÇÃO DE
BIODIESEL E SUAS MISTURAS DE
DIESEL COM AVALIAÇÃO
FITOTOXICOLÓGICA**

Aluna: Márcia Fernanda Alves da Rocha

**Orientadores: Profa. Dra. Sandra Maria Sarmento
Profa. Dra. Olga Martins Marques
Coorientador: Prof. Dr. Nelson Medeiros**

Recife/ 2016

MÁRCIA FERNANDA ALVES DA ROCHA

**BIO E FOTODEGRADAÇÃO DE BIODIESEL E SUAS MISTURAS
DE DIESEL COM AVALIAÇÃO FITOTOXICOLÓGICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.
Área de concentração: Engenharia Química
Linha de pesquisa: Processos bioquímicos.

Orientadores: Profa. Dra. Sandra Maria Sarmento
Profa. Dra. Olga Martins Marques
Coorientador: Prof. Dr. Nelson Medeiros

RECIFE/ 2016.

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

R672b	Rocha, Márcia Fernanda Alves da. Bio e fotodegradação de biodiesel e suas misturas de diesel com avaliação fitotoxicológica / Márcia Fernanda Alves da Rocha. - 2016. 153 folhas, il., gráfs., tabs. Orientadoras: Profa. Dra. Sandra Maria Sarmento. Profa. Dra. Olga Martins Marques. Coorientador: Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2016. Inclui Referências, Apêndices e Anexo. 1. Engenharia Química. 2. Biodegradação aeróbia. 3. Biodiesel. 4. Fitotoxicidade. I. Sarmento, Sandra Maria. (Orientadora). II. Marques, Olga Martins. (Orientadora). III. Lima Filho, Nelson Medeiros de. (Coorientador). IV. Título. UFPE 660.2 CDD (22. ed.) BCTG/2016-331
-------	--

MÁRCIA FERNANDA ALVES DA ROCHA

**BIO E FOTODEGRADAÇÃO DE BIODIESEL E SUAS MISTURAS
DE DIESEL COM AVALIAÇÃO FITOTOXICOLÓGICA**

Linha de Pesquisa: Processos Bioquímicos

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, defendida e aprovada em 14 de setembro de 2016 pela banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Sandra Maria Sarmiento/DEQ-UFPE
(Orientadora)

Profa. Dra. Olga Martins Marques/DEQ-UFPE
(Orientadora)

Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho/DEQ-UFPE
(Coorientador)

Prof. Dr. Luciano Costa Almeida/DEQ-UFPE
(Examinador Interno)

Profa. Dra. Gloria Maria Vinhas/DEQ-UFPE
(Examinadora Interna)

Profa. Dra. Janete Magali de Araujo/DA-UFPE
(Examinadora Externa)

Profa. Dra. Sara Horacio de Oliveira Maciel/DEQ-UFPE
(Examinadora Externa)

Profa. Dra. Maria de Fatima Vieira de Queiroz Sousa/DA-UFPE
(Examinadora Externa)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela ddiva da minha vida e saúde, pela minha família abençoada e por mais uma grande vitória.

Agradeço as minhas orientadoras Profa. Dra. Sandra Maria Sarmento, a Profa. Dra. Olga Martins Marques e ao co-orientador Prof. Dr. Nelson Medeiros a orientação e contribuição durante a realização deste trabalho.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química e aos professores do curso de Engenharia Química, pelos ensinamentos.

Ao corpo técnico dos Laboratórios de Microbiologia e Processos Biotecnológicos, Laboratório de Engenharia Ambiental e da Qualidade (LEAQ), Laboratório de Cromatografia Industrial e Laboratório de Combustíveis e Energia (POLICOM) pelos ensinamentos repassados.

A amiga Cristiane Marcelina de Moraes e aos estagiários pela ajuda constante para as realizações das análises com o intuito da finalização deste trabalho.

A CAPES pela concessão de bolsa.

A Universidade Federal de Pernambuco, os professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química pela oportunidade de concluir este trabalho. Finalmente, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O impacto de combustíveis sobre o meio ambiente é de grande interesse devido à possibilidade da ocorrência de derramamentos. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a toxicidade e a biodegradação dos combustíveis diesel (D), biodiesel de algodão (B100) e suas misturas (Bx) em meio aquoso. A toxicidade dos combustíveis em diferentes concentrações foi analisada em sementes de alface. Os resultados mostraram que a toxidez está associada ao tipo e à concentração do combustível, sendo o diesel o mais tóxico. Um ensaio preliminar foi realizado para investigar o potencial de biodegradação dos combustíveis-teste (B100, D e B20) pelos micro-organismos *Saccharomyces cerevisiae* e *Pseudomonas aeruginosa* não adaptados e adaptados por um período de 12 dias. Foram mensuradas a concentração de células viáveis, pH, DQO, DBO₅ e a toxicidade. A eficiência do processo de biodegradação se comportou da seguinte forma: biodiesel (B100) > Mistura B20 > diesel. A *P. aeruginosa* adaptada apresentou o maior potencial de remoção da matéria orgânica no processo de biodegradação dos combustíveis, e por isso foi o micro-organismo utilizado nos ensaios subsequentes. Ensaio em batelada foram conduzidos em um biorreator do tipo tanque sob condições de agitação (250rpm) e aeração (0,5 vvm), a fim de ser investigada a biodegradação aeróbia do B100 (Ensaio 1 e 2) e do B20 (Ensaio 3) por um período de 62 dias. Os Ensaio 2 e 3 foram realizados com adição suplementar de KNO₃ ao 7º dia de processo. Foram mensuradas a concentração de células viáveis, pH, DQO, DBO₅, teor de ésteres de ácidos graxos e toxicidade. Os ensaios revelaram que a *P. aeruginosa* adaptada foi capaz de biodegradar, mas não de mineralizar estes combustíveis. As cinéticas de biodegradação revelaram um perfil cinético de decaimento de reação de primeira ordem e foi observado que o composto com maior número de ligações insaturadas (C18:2) foi o que apresentou um maior coeficiente de biodegradação, levando menor tempo de meia-vida de 18 dias para ser degradado. Em todos os casos ocorreu redução da concentração de células viáveis de 10⁷ UFC.cm⁻³ para 10⁴UFC.cm⁻³. Em relação aos ésteres metílicos, observou-se degradação de 37,51% e 34,82% para o C16:0 nos Ensaio 1 e 2, respectivamente. Os demais ésteres apresentaram 100% de degradação. Realizou-se também estudo da degradação do biodiesel por fotólise (abiótico) irradiado (254 nm), variando-se as velocidades de agitação (750 e 2000 rpm), por período de 28.200 segundos dos principais ésteres metílicos palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoléico (C18:2), resultou numa redução de 87,08% (C18:2), 86,04% (C18:1) e 86,08% (C16:0), para rotação de 2000 rpm e de 100% de redução, para o ensaio à 750 rpm. Observou-se em todos os experimentos (bióticos e abióticos) que houve uma redução do pH e que esta redução está relacionada com as reações de degradação da mistura reagente.

Palavras-chave: Biodegradação aeróbia. Biodiesel. Fitotoxicidade.

ABSTRACT

The impact of fuel on the environment is of great interest due to the possibility of the occurrence of spillage. The aim of this study was to evaluate the toxicity and biodegradation of diesel fuel (D), cotton biodiesel (B100) and your mixtures (Bx) in aqueous medium. The toxicity of the fuels in different concentrations was analyzed on lettuce seeds. The results showed that the toxicity is associated with the type and concentration of the fuel being the most toxic diesel. A preliminary test was conducted to investigate the potential for degradation of the test fuel (B100, B20 and D) by microorganism *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* not suited and adapted for a period of 12 days. We measured the concentration of viable cells, pH, COD, BOD₅ and toxicity. The efficiency of the biodegradation process behaved as follows: biodiesel (B100) > B20 > Diesel. The *P. aeruginosa* adapted showed the greatest potential for removal of organic matter in fuel biodegradation process and so was the microorganism used in subsequent trials. Batch tests were conducted in a bioreactor tank-type stirring conditions (250 rpm) and aeration (0,5vvm) to be investigated aerobic biodegradation B100 (Assay 1 and 2) and B20 (Assay 3) a period of 62 days. Runs 2 and 3 were performed with further adding KNO₃ to the 7th day process. We measured the concentration of viable cells, pH, COD, BOD₅ content of fatty acid esters and toxicity. The tests revealed that the adapted *P. aeruginosa* was able to mineralize not biodegrade but these fuels. The kinetics of biodegradation showed a kinetic profile of first order reaction decay and it was observed that the compound more unsaturated bonds (C18: 2) showed the higher coefficient of biodegradation, taking shorter half-life 18 days to be degraded. In all cases there was a reduction in the concentration of 10^7 UFC.cm⁻³ of viable cells to 10^4 UFC.cm⁻³. In relation to methyl ester, there was degradation of 37.51% and 34.82% for C16: 0 in runs 1 and 2, respectively. The remaining esters showed 100% degradation. It also conducted the study of degradation of biodiesel by photolysis (abiotic) irradiated (254 nm) varying the stirring speed (750 to 2000 rpm) for 28.200 seconds period of the main methyl esters palmitic (C16: 0), oleic (C18: 1) and linoleic (C18: 2) resulted in a reduction of 87.08% (C18:2) 86.04% (C18:1) and 86.08% (C16:0) for rotation 2000 rpm and 100% reduction to the test at 750 rpm. It was observed in all experiments (biotic and abiotic) that a reduction of pH and that this reduction is related to the degradation reactions of the reaction mixture.

Keywords: Aerobic biodegradation. Biodiesel. Phytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Transesterificação de triglicerídeo com álcoois. Fonte: MOSER, (2009)	18
Figura 2- Algodão" <i>in natura</i> ". Fonte: QUEIROZ e RIBEIRO (2010)	21
Figura 3- Macrografia :Câmara incubadora contendo os balões.....	56
Figura 4- Macrografia : Biorreator de bancada Biostat [®] B.....	57
Figura 5- Macrografia: 1. Fotoreator, 2. Lâmpada UV, 3. Agitador, 4. Tanque de reciclo, 5. Ponto de amostragem, 6. Dreno, 7. Bomba, 8. Condensador.....	58
Figura 6- Curva de crescimento celular para a <i>P. aeruginosa</i> (a) e curva da fase exponencial (b), Meio de Cultura Mínimo com glicose, 30°C, 120 rpm.....	65
Figura 7- Curva de crescimento celular para a <i>S. cerevisiae</i> (a) e curva da fase exponencial (b), Meio de Cultura Mínimo com glicose, 30°C, 120 rpm.....	66
Figura 8- Macrografia das sementes de alface após serem submetidas aos Ttox: (a) Teste de controle positivo (CP); (b) Teste de controle negativo (CN).....	68
Figura 9- Efeito da acidez da água destilada sobre os parâmetros do método de germinação.....	69
Figura 10- Efeito da acidez na água destilada contendo LESS70 disperso sobre os parâmetros de fitotoxicidade (Concentração de LESS70: $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$).....	72
Figura 11- Macrografia das sementes de alface após serem submetidas aos Ttox. (a) Água destilada com LESS70 a pH7; (b) Água destilada pura a pH neutro (controle negativo).....	72
Figura 12- Curvas de sub-letalidade para águas modelos formuladas com Combustíveis e $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70 ($6 < \text{pH} < 7$).....	74
Figura 13- Curvas dose-resposta para as águas modelos formuladas com os Combustíveis e $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70 ($6 < \text{pH} < 7$).....	75
Figura 14- Parâmetros de toxidade %I e %C em função do pH para águas-modelos contendo B100 (5% v/v) e LESS70 ($1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$).....	76
Figura 15- Parâmetros de toxidade %I e %C em função do pH para águas-modelos contendo B20 (5% v/v) e LESS70 ($1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$).....	77
Figura 16- Evolução dinâmica do pH da fase líquida da mistura reagente para o Diesel (D), Mistura B20 e B100 pela <i>P. aeruginosa</i> não adaptada (D-1, B20-1 e B100-1) e <i>P. aeruginosa</i> adaptada (D-2, B20-2 e B100-2).....	78
Figura 17- Evolução dinâmica do pH da fase líquida da mistura reagente para o Diesel, Mistura B20 e B100 pela <i>S. cerevisiae</i> não adaptada (D-1, B20-1 e B100-1) e <i>S. cerevisiae</i> adaptada (D-2, B20-2 e B100-2)	79
Figura 18- Evolução dinâmica da concentração de biomassa da <i>P. aeruginosa</i> não adaptada (D-1, B20-1 e B100-1) e <i>P. aeruginosa</i> adaptada (D-2, B20-2 e B100-2).....	80
Figura 19 - Evolução dinâmica da concentração de biomassa da <i>S. cerevisiae</i> não adaptada (D-1, B20-1 e B100-1) e <i>S. cerevisiae</i> adaptada (D-2, B20-2 e B100-2).....	81
Figura 20- Evolução dinâmica da biodegradabilidade do diesel em termos da relação DQO/DBO ₅ do meio líquido pela <i>P. aeruginosa</i> [não adaptada (D-1) e adaptada (D-2)] (a) e <i>S. cerevisiae</i> [não adaptada (D-1) e adaptada (D2)] (b).....	82
Figura 21- Evolução dinâmica da biodegradabilidade do B100 em termos da relação DQO/DBO ₅ do meio líquido pela <i>P. aeruginosa</i> [não adaptada (B100-1) e adaptada	83

(B100-2)] (a) e <i>S. cerevisiae</i> [não adaptada (B100-1) e adaptada (B100-2)] (b).....	
Figura 22- Evolução dinâmica da biodegradabilidade do B20 em termos da relação DQO/DBO ₅ do meio líquido pela <i>P. aeruginosa</i> [não adaptada (B20-1) e adaptada (B20-2)] (a) e <i>S. cerevisiae</i> [não adaptada (B20-1) e adaptada (B20-2)] (b).....	84
Figura 23- Parâmetros de toxicidade de C% e %I da fase líquida da mistura reagente para o Diesel e 1,1x10 ⁻² g.cm ⁻³ de LESS70, [D-1- <i>P. aeruginosa</i> , D2- <i>P. aeruginosa</i>] (a) e [D-1- <i>S. cerevisiae</i> , D2- <i>S. cerevisiae</i>] (b)]	86
Figura 24- Parâmetros de toxicidade de C% e %I da fase líquida da mistura reagente para o B100 e 1,1x10 ⁻² g.cm ⁻³ de LESS70, [B100-1 <i>P. aeruginosa</i> , B100-2 <i>P. aeruginosa</i>] (a) e [B100-1- <i>S. cerevisiae</i> , B100-2 <i>S. cerevisiae</i>] (b)].....	87
Figura 25- Parâmetros de toxicidade de C% e %I da fase líquida da mistura reagente para o Mistura B20 e 1,1x10 ⁻² g.cm ⁻³ de LESS70, [B20-1 <i>P. aeruginosa</i> , B20-2 <i>P. aeruginosa</i>] (a) e [B20-1- <i>S. cerevisiae</i> , B20-2 <i>S. cerevisiae</i>] (b)].....	88
Figura 26- Curva de decaimento de primeira ordem dos principais compostos (C16:0) e (C18:2) presentes no biodiesel de algodão ao longo do processo de biodegradação. (5% v/v de B100; 1,1x10 ⁻² g.cm ⁻³ de LESS70); 30° C; 250 rpm; 0,5 v.v.m de ar. (a) B100 sem adição suplementar de KNO ₃ e (b) B100 com adição suplementar de KNO ₃	90
Figura 27- Percentual de biodegradação dos EMAG constituintes do biodiesel de algodão.....	91
Figura 28- Evolução dinâmica do pH na biodegradação dos combustíveis dissolvidos em água (5% v/v de B100/B20; 1,1x10 ⁻² g.cm ⁻³ de LESS70; 30° C; 250 rpm; 0,5 v.v.m de ar).....	93
Figura 29- Evolução dinâmica da concentração da biomassa microbiana para o processo de biodegradação dos B100 e Mistura B20 (5% v/v de B100/B20; 1,1x10 ⁻² g.cm ⁻³ de LESS70; 30° C; 250 rpm; 0,5 v.v.m de ar).....	95
Figura 30- Evolução dinâmica da relação DQO/DBO ₅ da fase líquida da mistura reagente para o processo de biodegradação dos B100 e Mistura B20 (5% v/v de B100/B20; 1,1x10 ⁻² g.cm ⁻³ de LESS70; 30° C; 250 rpm; 0,5 v.v.m de ar).....	96
Figura 31- Evolução dinâmica do parâmetro de fitotoxicidade %I e % C na biodegradação dos combustíveis dissolvidos em água (5% v/v de B100/B20; 1,1x10 ⁻² g.cm ⁻³ de LESS70; 30° C; 250 rpm; 0,5 v.v.m de ar).....	97
Figura 32- Perfil dinâmico do teor em massa normalizado dos principais EMAG presentes na mistura ao longo do processo de fotólise do B100 a 5% (v/v) a 750 rpm.....	100
Figura 33- Perfil dinâmico do teor em massa normalizado dos principais EMAG presentes na mistura ao longo do processo de fotólise do B100 a 5% (v/v) a 2000 rpm.	100
Figura 34- Evolução dinâmica do pH da fase líquida das misturas reagentes: B100 5% (v/v) a 750 rpm e 2000 rpm.....	101
Figura 35- Evolução dinâmica da relação DQO/DBO ₅ da fase líquida da mistura reagente para o B100 a 5% (v/v) para 750 rpm e 2000 rpm.....	102
Figura 36- Evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade %I e C% na degradação do combustível dissolvido em água (5% v/v de B100; 1,1x10 ⁻² g.cm ⁻³ de LESS70; 30 °C).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição do Meio de Cultura Mínimo em água destilada (100 cm ³).....	52
Tabela 2- Esquema experimental dos estudos preliminares.....	55
Tabela 3- Composição dos B100 de algodão produzidos em termos dos EMAG.....	63
Tabela 4- Teor de EMAG saturados e insaturados para os B100.....	63
Tabela 5- Efeito da acidez na água destilada sobre os parâmetros de fitotoxicidade....	69
Tabela 6- Efeito da acidez na água destilada contendo LESS70 disperso sobre os parâmetros de fitotoxicidade (concentração de LESS 1,1x10 ⁻² g.cm ⁻³).....	71
Tabela 7- Percentual de remoção da matéria orgânica.....	85
Tabela 8- Valores iniciais para os parâmetros do processo de biodegradação dos combustíveis B100 e Mistura B20.....	89
Tabela 9- Coeficientes de biodegradação dos ésteres metílicos (C16:0) e (C18:2).....	92
Tabela 10- Tempo de meia vida no processo de biodegradação dos ésteres metílicos (C16:0) e (C18:2).....	92

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

AB	Alta biodegradabilidade
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Abs	Absorbância
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ATP	Adenosina trifosfato
B100	Biodiesel de algodão
B5	Mistura: 95% de diesel e 5% de biodiesel (v/v)
B7	Mistura: 93% de diesel e 3% de biodiesel (v/v)
B8	Mistura: 92% de diesel e 8% de biodiesel (v/v)
B10	Mistura: 90% de diesel e 10% de biodiesel (v/v)
B20	Mistura: 80% de diesel e 20% de biodiesel (v/v)
B25	Mistura: 75% de diesel e 25% de biodiesel (v/v)
B30	Mistura: 70% de diesel e 30% de biodiesel (v/v)
B40	Mistura: 60% de diesel e 40% de biodiesel (v/v)
B50	Mistura: 50% de diesel e 50% de biodiesel (v/v)
B80	Mistura: 80% de diesel e 20% de biodiesel (v/v)
BD	Baixa biodegradabilidade
BHT	Butil - Hidroxitolueno
BTEX	Hidrocarboneto monoaromático benzeno,tolueno,etilbenzeno e xileno
Bx	Mistura do diesel com o biodiesel
% C	Percentual de Crescimento da Raiz
CE	Comunidade Europeia
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CG	Cromatografia gasosa
CG/MS	Cromatografia e espectrometria de massa
CL ₅₀	Concentração Letal
C:N	Carbono, Nitrogênio
C:N:P	Carbono, Nitrogênio, Fosforo
CoA	Coenzima A
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
CP	Controle positivo
D	Óleo diesel
DCPIP	2,6 Diclorofenol indofenol dihidratado
DEQ	Departamento de Engenharia Química
DEQ-UFPE	Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco
DL ₅₀	Dose Letal
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
D.O.	Densidade ótica da suspensão microbiana

DQO	Demanda química de oxigênio
EAAG	Ésteres alquílicos de ácidos graxos
Eh	Potencial redox
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
EMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
EMAG-Ins.	Ésteres metílicos de ácidos graxos insaturados
EMAG-Sat.	Ésteres metílicos de ácidos graxos saturados
FAD	Flavina Adenina dinucleotídeo
FADH	Flavina-Adenina-Dinucleotídeo
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i>
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
% G	Percentual de Germinação das Sementes de alface
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
% I	Percentual de Inibição das Sementes de alface
I _{AC}	Índice de acidez
IG	Índice de Germinação das Sementes de alface
LCI	Laboratórios de Cromatografia Industrial
LIMA	Laboratório Interdisciplinar de Meio Ambiente
LMPB	Laboratórios de Microbiologia e Processos Biotecnológicos
LPC	Laboratórios de Processos Catalíticos
MCM	Meio de cultura mínimo
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo
nm	Nanômetro
OD	Oxigênio Dissolvido
¹ O ₂	Oxigênio Singlete
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
pH	Potencial hidrogenionico
POLICOM	Laboratório de Combustíveis e Energia
rpm	Rotação por minuto
Ttox	Teste de toxicidade
TPP	Tiamina pirofosfato
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPEDA	Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
UFPEDEQ	Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco
USEPA	<i>United States Enviromental Protection Agency</i>
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta -Visível
v.v.m	Volume de ar por volume de meio
x	Fração volumétrica do B100 na mistura
X	Biomassa microbiana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Biodiesel	17
2.1.1 Biomassas lipídicas utilizadas na produção do biodiesel.....	19
2.1.1.1 Algodão.....	21
2.2 Diesel mineral.....	22
2.3 Misturas do diesel mineral com biodiesel.....	23
2.4 Biodegradação de poluentes orgânicos	23
2.5 Bioquímica da biodegradação.....	33
2.6 Biodegradação do diesel mineral	36
2.7 Biodegradabilidade do biodiesel e das Misturas Bx	39
2.7.1 Cinética de Biodegradação.....	43
2.8 Degradabilidade oxidativa do biodiesel.....	44
2.9 Toxicidade.....	45
3 MATERIAIS E METODOS	50
3.1 Materiais	50
3.1.1 Combustíveis, substância tensoativa e reagentes.....	50
3.2 Metodologia Experimental.....	50
3.2.1 Produção do Biodiesel.....	50
3.2.2 Preparação das Misturas Bx.....	51
3.3 Micro-organismos	52
3.3.1 Meio de Cultura	52
3.3.2 Adaptação das Linhagens Microbianas Puras.....	53
3.3.3 Curva de Padronização dos Inóculos	53
3.4 Estudo da Fitotoxicidade dos Combustíveis	54
3.4.1 Teste de Tóxicidade (T _{tox})	54
3.5 Processo Biodegradativo dos combustíveis.....	54
3.5.1 Estudos Preliminares	54
3.5.2 Cinética da Biodegradação em Biorreator tipo Tanque.....	56
3.5.2.1 Sistema Experimental	57
3.6 Estudo da Degradação por Fotólise direta a 254 nm (Fotoreator anular)...	58

3.6.1 Sistema Experimental.....	58
3.7 Determinações Analíticas.....	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
4.1 Análise da Matéria prima.....	62
4.1.1 Óleo de algodão	62
4.1.2 Biodiesel.....	62
4.2 Curva de Crescimento para Padronização do Inóculo.....	64
4.3 Estudo da Fitotoxicidade.....	66
4.3.1 Análise da Fitotoxicidade das Águas Modelos.....	66
4.3.1.1 Testes Preliminares.....	67
4.3.1.1.1 Sensibilidade das Sementes	67
4.3.1.2 Estudo da Fitotoxicidade da Água Destilada a Diferentes Valores de pH.....	68
4.3.1.3 Estudo da Fitotoxicidade da Água Destilada contendo LESS70 a Diferentes Valores de pH.	70
4.3.1.4 Efeito da concentração dos Combustíveis nas Águas Modelos.....	73
4.3.1.5 Efeito do pH para Águas Modelos com LESS 70 e biocombustível....	76
4.4 Biodegradação aeróbia dos Combustíveis.....	78
4.4.1 Estudo preliminar	78
4.5 Estudo do Processo de Biodegradação em Biorreator Tipo Tanque	89
4.5.1 Cinética de Biodegradação.....	89
4.6 Degradação do Biodiesel por Fotólise	99
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	105
6 REFERENCIAS.....	108
APÊNDICE A.....	125
APÊNDICE B.....	126
APÊNDICE C.....	134
APÊNDICE D.....	139
APÊNDICE E.....	142
APÊNDICE F.....	144
ANEXOS.....	147

1. INTRODUÇÃO

A produção de biocombustíveis surgiu como uma abordagem importante para permitir a independência energética, reduzindo emissões de gases do efeito estufa, revitalizando comunidades rurais e melhorando o desenvolvimento sustentável (XIA *et al.*, 2011).

O biodiesel, tradicionalmente produzido a partir de óleos vegetais e gorduras animais, é uma alternativa atraente por ser biodegradável com percentual de biodegradabilidade de 98% em 21 dias de processo (LEUNG *et al.*, 2005). Além disso, é atóxico, apresenta características renováveis, bem como propriedades semelhantes ao diesel convencional (DEMIRBAS, 2008; LIANG & JIANG, 2013) e que podem substituir parcial ou totalmente os combustíveis derivados de petróleo ou gás natural em motores à combustão ou em outro tipo de geração de energia. Algumas características do biodiesel podem torná-lo ainda mais vulnerável à biodegradação do que ao diesel de petróleo tais como: a ausência de moléculas aromáticas, disponibilidade de pontes de éster de alta energia e às propriedades higroscópicas (BÜCKER, 2009).

No Brasil, devido à escassez do óleo diesel, misturas desses combustíveis têm sido formuladas, com proporção de biodiesel variando de 1 a 99% (v/v) sendo fixado, em volume, o percentual mínimo obrigatório comercializado, em função da lei n. 11.097/2005 a partir de 2% em janeiro de 2008.

Por outro lado, quando ocorrem acidentes ambientais envolvendo o aporte de óleo e/ou derivados em ambientes marinhos, muitos são os tipos de problemas sentidos pela fauna e flora e, conseqüentemente, pela comunidade humana que vive nas proximidades das áreas atingidas pelos poluentes (GOGOU *et al.*, 2000).

A contaminação causada pela exploração do petróleo e seus derivados causa grande impacto ambiental, pois essas substâncias apresentam propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas aos seres humanos (MULLIGAN, 2009; SOUZA *et al.*, 2014). O acúmulo de petróleo e seus derivados no meio ambiente tem efeito tóxico sobre os seres vivos cuja toxicidade pode ser avaliada pela taxa de mortalidade de organismos representativos de importância econômica ou ecológica (CHAPMAN, 2002; JUVONEM *et al.*, 1999).

Constantes acidentes ambientais envolvendo derramamentos de petróleo e seus derivados vêm desencadeando a preocupação, com o desenvolvimento de técnicas que objetivam a descontaminação das regiões impactadas (ŁAWNICZAK *et al.*, 2013).

O efeito tóxico do material no ambiente pode ser minimizado por métodos abióticos como a remoção, a separação, a adição de surfactantes e a decomposição fotoquímica, e por ação biológica (biorremediação) (ATLAS 1995a; ATLAS 1995c).

Na biorremediação os micro-organismos são os principais agentes degradadores, devido à sua abundância, diversidade de espécies, e sua versatilidade catabólica e anabólica, bem como à sua capacidade de adaptação a condições ambientais adversas (MORAES & TORNISIELO, 2009). Estes atuam degradando frações do poluente, como fonte de carbono para o seu crescimento, podendo torná-lo menos tóxico que o composto original (FENG *et al.*, 2000).

O potencial microbiano de degradação pode ser potencializado pela relação carbono: nitrogênio, que é essencial ao metabolismo microbiano para aumentar a velocidade de biodegradação, sendo esse procedimento chamado de bioestimulo (WALTER, 1997; KOWALICK, 1991).

O biodiesel, apesar de ser considerado um combustível de origem renovável, menos poluente e biodegradável, tem sistemas de distribuição e armazenamento, geralmente, localizados na superfície e, desta forma, no caso de um vazamento, pouco se tem conhecimento sobre os reais impactos da interação do biodiesel e da mistura diesel/biodiesel com o solo e a água subterrânea, e dos riscos toxicológicos associados à liberação destes no meio ambiente.

O tratamento biológico de resíduos gerados pelo setor petrolífero já é realidade nos dias atuais cujas aplicações variam conforme as características do sítio contaminado; potencialidades da microbiota presente; natureza da operação com o derivado de petróleo (armazenamento e distribuição) incluindo, naturalmente, a relação custo-benefício (KHAN *et al.*, 2004).

Vários micro-organismos têm sido apontados como potencialmente biodegradadores do B100 e óleo diesel, dentre os citados na literatura, encontram-se: a) bactérias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovarans*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Marinomonas vaga*, dentre outros (FOLLIS, 1994; VIEIRA *et al.*, 2016); b) leveduras: *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces*, assim como os gêneros *Sporobolomyces* são degradadores de uma mistura de hidrocarbonetos (ZHANG *et al.*, 1998 ; LEUNG *et*

al.,2005); c) fungos filamentosos: *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* (ZIINO et al.,1999).

Apesar de se saber que a bactéria *P. aeruginosa* e a levedura *S. cerevisiae* têm habilidade microbiana para degradar combustíveis, poucas pesquisas têm focado sobre informações toxicológicas do óleo diesel e biodiesel em ambiente aquático e o benefício da adição deste ao diesel, em termos da toxicidade.

Sendo assim, o objetivo principal desta tese foi avaliar a biodegradabilidade aeróbia do biodiesel de algodão por *Pseudomonas aeruginosa* adaptada e os efeitos da adição suplementar do KNO_3 na degradação dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no biodiesel, comparar ao processo de degradação por fotólise direta a 254 nm bem como realizar a análise da fitotoxicidade do material degradado utilizando como organismo-teste a semente de alface (*Lactuca sativa L.*).

Os objetivos específicos envolvem:

- Estudar o efeito da fitotoxicidade de Águas modelos artificialmente contaminadas com os combustíveis (óleo diesel, Misturas Bx e biodiesel);
- Realizar estudo preliminar de biodegradação do B100, D e Mistura B20 com *Pseudomonas aeruginosa* ou *Saccharomyces cerevisiae* não adaptados e adaptados para estimar o micro-organismo mais eficiente no processo biodegradativo.
- Estudar a cinética do processo de biodegradação do B100 e da Mistura B20 em biorreator tipo tanque com o micro-organismo escolhido no estudo preliminar.
- Avaliar o processo de degradação por fotólise direta do B100.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biodiesel

O biodiesel (B100) é uma denominação genérica para combustíveis e aditivos derivados de fontes renováveis (XUE *et al*, 2011), e quando comparado ao óleo diesel derivado do petróleo, pode reduzir em 78% as emissões líquidas de gás carbônico. Tem recebido atenção intensa devido à existência de fontes de petróleo limitadas, o rápido crescimento do preço deste insumo e a preocupação com o meio ambiente.

O biodiesel é um combustível composto de uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos (EAAG) provenientes de biomassas lipídicas que podem ser de origem vegetal, animal ou de micro-organismo e tem sido apontado como um combustível limpo, biodegradável (VAUHKONEN *et al*, 2008; KNOTHE, 2006), não inflamável (MA & HANNA, 1999; VON WEDEL & POINT RICHMOND, 1999), menos tóxico comparado ao óleo diesel devido ser livre de enxofre (MOSER, 2011; VON WEDEL & POINT RICHMOND, 1999), de compostos aromáticos (SHARMA & SINGH, 2009; STRONG *et al*, 2004; VON WEDEL & POINT RICHMOND, 1999), e de metais, alternativo ao óleo diesel com características semelhantes ao diesel comum (FERRARI *et al*. 2005). Tem disponibilidade elevada a partir de fontes comuns de biomassa, além de características não poluentes que contribuem para a sustentabilidade.

A baixa complexidade estrutural do biodiesel deve-se a composição predominantemente de oito diferentes ácidos graxos (C16-C18) metil esterificados, incluindo oleato, palmitato, estearato, linoleato, mirístico, laureato e linolenato cuja concentração de cada ácido graxo varia de acordo com a fonte de origem do biodiesel (MURUGESAN *et al.*, 2009).

O biodiesel pode ser constituído de ácidos graxos insaturados em teores altos ou baixos suscetíveis as reações de oxidação, e aceleradas pela presença de oxigênio, altas temperaturas e luz natural, podendo resultar compostos poliméricos prejudiciais ao motor. Com relação às vantagens do biodiesel, pode-se citar: a) alternativa para o óleo diesel (D); b) é uma fonte de combustível renovável; c) reduz o impacto sobre o meio-ambiente; d) os gases de emissão são menos agressivos; e) é biodegradável (VICENTE *et al.*, 2004).

Dentre os métodos viáveis existentes para se produzir o B100 destaca-se a transesterificação que é um processo de conversão de triglicerídeos a ésteres de ácidos graxos e glicerina, onde se recomenda uma razão molar de metanol/óleo 6:1 para assegurar uma máxima conversão de triglicerídeos em ésteres em presença de um catalisador (ácido ou base forte).

Conforme Knothe *et al.* (2006) para a transesterificação (Figura 1) proporcionar rendimentos máximos, o álcool deve ser livre de umidade e o conteúdo de ácidos graxos livres (AGL) do óleo deve ser inferior a 0,5%.

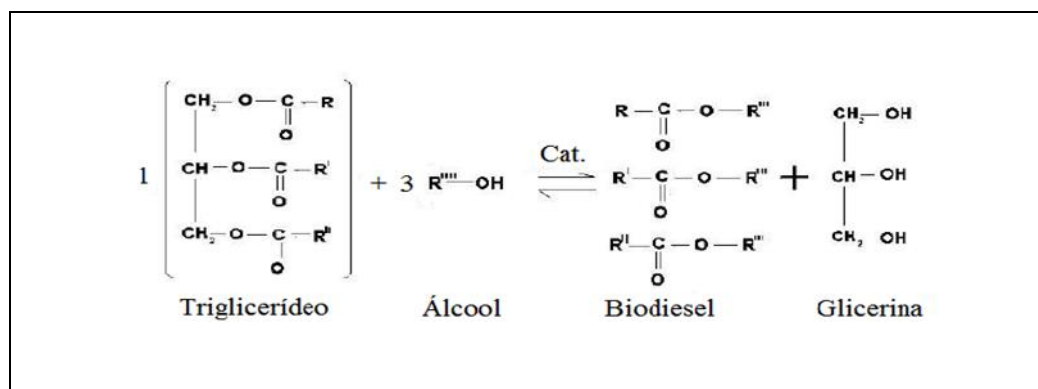


Figura 1- Transesterificação de triglicerídeo com álcoois. (Fonte: MOSER, 2009).

O número de carbonos, insaturações e a configuração geométrica do B100 são determinantes no metabolismo dos ácidos graxos. O B100 produzido no território brasileiro é regulamentado pela Resolução ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) N° 3/2014 (Tabela A1 do Anexo A). Os ácidos graxos, palmítico e esteárico apresentam oxidação a CO₂ e H₂O e liberam grande quantidade de energia metabólica (PELCZAR *et al.*, 1997).

A partir de 1° de janeiro de 2010 com base na lei N° 11.097/2005 passou a ser obrigatória a mistura de 5% de B100 ao óleo diesel consumido no Brasil para reduzir a emissão de CO₂ e de material particulado. Portanto, o biodiesel pode ser definido como um combustível composto de mono-álquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais. Dependendo da matéria-prima, podendo ser originado de gordura animal (usualmente sebo), óleos vegetais (óleos de soja, caroço de algodão, palma, mamona, canola, girassol, coco) ou ainda, óleos de descarte (óleos de descarte de frituras).

2.1.1 Biomassas lipídicas utilizadas na produção do biodiesel

As diversas biomassas lipídicas são fontes disponíveis do primeiro substrato da reação de produção de B100, ou seja: os triglicerídeos. De acordo com Morrison e Boyd (1992), os triglicerídeos são ésteres da união de três ácidos graxos (R1, R2, R3) cujas cadeias carbônicas podem ser de mesmo tamanho ou não, a uma molécula de glicerol tendo suas três hidroxilas ligadas aos radicais carboxílicos.

As propriedades físicas dos triglicerídeos dependem da estrutura e da distribuição dos ácidos graxos (AG) que compõem sua molécula (CLAUSS, 1996, LIMA & NASSU, 1996), são componentes naturais de óleos e gorduras que são substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana, formadas predominantemente de produtos de condensação entre glicerina e ácidos graxos chamados triglicerídeos e pertencem à classe dos lipídeos (MORETTO & FETT, 1989). Os ácidos graxos diferem entre si a partir de três características: a) tamanho da cadeia carbônica, b) número de insaturações e c) presença de grupamentos químicos.

Os AG que possuem ligações simples entre dois átomos de carbonos, saturados, são: valérico (C5:0), caproíco (C6:0), enântico (C7:0), caprílico (C8:0), capríco (C10:0), undecanóico (C11:0), laurístico (C12:0), tridecanóico (C13:0), mirístico (C14:0), pentadecanóico (C15:0), palmítico (C16:0), margárico (C17:0), esteárico (C18:0), araquídico (C20:0), behêmico (C22:0), tricosanoíco (C23:0), lignocérico (C24:0) e outros. Aqueles que apresentam duplas ligações entre dois átomos de carbono são denominados de ácidos graxos insaturados, tais como os ácidos: miristioleico (C14:1), pentadecenóico (C15:1) palmitoléico (C16:1), cis-heptadecenoico (C17:1), oléico (C18:1), linoléico (C18:2), linolênico (C18:3), gadolêico (C20:1), erúico (C22:1), nervônico (C24:1) dentre outros (MORRISON & BOYD, 1992; MA & HANNA, 1999).

Os ácidos graxos são compostos apolares, ou seja, as regiões polares de seus precursores desapareceram durante a formação das ligações do tipo éster, sendo, portanto, hidrofóbicos. São insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, tais como, os álcoois metílico, etílico e propílico, a benzina, o éter e o clorofórmio. Os triglicerídeos líquidos (óleos) têm seu conteúdo de AG insaturados elevado. Aqueles triglicerídeos sólidos ou pastosos à temperatura ambiente são conhecidos como gorduras que são insumos que predominam o AG saturado (MORRISON & BOYD,

1992). Os triglicerídeos são reconhecidos como óleos ou gorduras produzidos e armazenados nos organismos dos seres vivos para fins de reserva alimentar cujas fontes mais comuns são: vegetal, animal e microbiológica.

As plantas oleaginosas são fontes comuns de triglicerídeos cujo teor de óleo varia conforme a espécie. Os óleos vegetais, comestíveis e não-comestíveis, são constituídos de: 90 a 98% de triglicerídeos e de um pequeno percentual de diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres (AGL), água, esteróis, fosfolipídios (também conhecidos como gomas), odorantes e outras impurezas. Muitos dos óleos comestíveis e não-comestíveis obtidos de oleaginosas crescem em diferentes regiões do mundo e têm sido empregados para produzir B100 com sucesso, ou seja, com rendimento de processo superior a 0,9 kg B100/kg óleo (MOSER, 2009). Encontrando-se comumente dentre esses, os óleos de: girassol, canola, algodão, soja, dendê (ou palma), milho, coco e amendoim.

Várias outras oleaginosas também são passíveis de extração de óleos vegetais para a produção do biodiesel em larga escala, sendo o Brasil um dos países que apresenta, de forma palpável, esta possibilidade. Nesse contexto, salienta-se que a biodiversidade da região nordeste do Brasil dispõe de diversas espécies oleaginosas perenes, nativas e adaptadas às condições do seu clima semiárido desfavorável, encontrando-se entre estas a oiticica (*Licania rigida*), a mamona (*Ricinus communis*), o catolé (*Syagrus smithii*), o pinhão-manso (*Jatropha curcas*), a macaúba (*Acrocomia aculeata*), a palmeira-indaiá (*Attalea dubia*), o buriti (*Mauritia flexuosa*), o pequi (*Caryocar brasiliense*), a pupunha (*Bactris gasipaes*) e o algodão (*Gossypium hirsutum* L.).

As viabilidades técnica e econômica de uma biomassa de origem vegetal dependem de suas respectivas competitividades técnica econômica e socioambiental, inclusive, de aspectos agrônômicos como: a) teor de óleo, b) produtividade/unidade área, c) equilíbrio agrônômico e demais aspectos do ciclo da planta, d) atuação em diferentes sistemas de produtividade, e) ciclo da planta, f) adaptação territorial (RAMOS *et al.*, 2003). Fatores como geografia, clima e economia determinam a biomassa de maior interesse para a produção de B100, fortalecendo sua flexibilidade no mundo (KNOTHE *et al.*, 2006). Especificamente no Brasil, tem-se a produção do biodiesel originário de plantas oleaginosas pautada na soja, no milho, no amendoim, no babaçu e na palma, sendo que 73,30% do volume total de B100 produzido no Brasil são provenientes do óleo de soja (AMARAL, 2009).

2.1.1.1 Algodão

A espécie de algodoeiro *Gossypium hirsutum* L.(Figura 2) produz sementes com línter, é responsável por 90% da produção mundial de algodão em caroço ou algodão em rama, bastante usada pela humanidade.

A semente de algodão, recoberta com línter é rica em óleo, contém em média 60% de caroço e 40% de fibra. Constitui uma das principais matérias-primas para a indústria de óleo comestível (ABOISSA, 2015).

O óleo das sementes de algodão apresenta coloração escura, provocada por pigmentos que acompanham o gossipol no interior das glândulas distribuídas nos cotilédones e hipocótilo.

Com o Programa Nacional de Biodiesel, o algodão pode ressurgir no semiárido, com ampla vantagem e renda para os produtores, desde que utilizem, devidamente, as tecnologias geradas ou adaptadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA) e outras instituições de pesquisa e desenvolvimento do nosso país (BELTRÃO *et al.*, 2003).

Na sub-região do semiárido nordestino, da qual corresponde a 70% do Nordeste brasileiro e 18% de todo território nacional, o algodão constitui uma opção de alto potencial para pequenos produtores ligados a agricultura familiar, seja para produção de fibras ou óleo para ser destinado a produção de biodiesel.

O biodiesel de algodão é mais viável, mais econômico no entanto, acaba em segundo lugar por não possuir mais estrutura ou demanda grande como subproduto, opostamente a soja.

De acordo com Dall'Agnol (2010), estima-se que noventa por cento do óleo vegetal produzido é de soja e outros quatro por cento provém do algodão.



Figura 2- Algodão "*in natura*".
Fonte: QUEIROZ & RIBEIRO (2015).

2.2. Diesel mineral

O óleo diesel é o produto oleoso mais abundante obtido a partir do refino do petróleo bruto. Sua composição apresenta, basicamente, hidrocarbonetos (compostos orgânicos que contêm átomos de carbono e hidrogênio) e, em baixas concentrações, enxofre, nitrogênio e oxigênio. É um produto inflamável, com nível médio de toxicidade, pouco volátil, sem material em suspensão, límpido, com cheiro forte e característico.

O óleo diesel como um combustível que pode ser definido como uma complexa mistura de hidrocarbonetos que variam de C9 a C30, contendo compostos aromáticos, n-alcanos, iso e cicloalcanos, enxofre, nitrogênio e compostos oxigenados.

A fração aromática contém hidrocarbonetos alquilados de um ou dois anéis conjugados até os poliaromáticos – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA).

É composto de moléculas com oito a quarenta átomos de carbono e são normalmente mais pesados e menos voláteis que a gasolina.

A fase solúvel em água do petróleo e dos seus combustíveis derivados é composta por uma mistura de HPA, BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno), fenóis, hidrocarbonetos alifáticos e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre. Dentre essas substâncias à alta detecção de HPA e de Hidrocarbonetos Monoaromáticos compostos de Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno (SIMONATO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010) que apresentam toxicidade e potencial carcinogênico. Apesar de estes compostos apresentarem potencial carcinogênico em baixas concentrações solúveis, os HPA possuem baixa solubilidade em água. E devido à sua natureza hidrofóbica, a solubilidade aquosa desses compostos diminui quando fazem parte de uma mistura, pois os outros constituintes da mistura tendem a permanecer no óleo devido a sua baixa polaridade. No entanto, os BTEX apresentam um elevado risco em derramamentos de combustíveis, pois são os hidrocarbonetos mais solúveis, além de serem voláteis e segundo Rodrigues *et al.* (2010) são os compostos mais abundantes na fase solúvel em água de petróleo e de seus derivados.

De acordo com sua aplicação, o óleo diesel pode ser classificado em seis tipos:

- tipo B (diesel interiorano) – com teor máximo de enxofre de 0,35%;
- tipo D (diesel metropolitano) – com teor máximo de enxofre de 0,20%;
- tipo S 500 – com teor máximo de enxofre de 0,05%;
- extra diesel aditivado;

- diesel de referência – também conhecido como diesel padrão;
- diesel marítimo – difere do automotivo apenas no ponto de fulgor.

Quanto ao teor de enxofre, os combustíveis comercializados ao consumidor final, possuem 50 mg/kg de enxofre (S50), 500 mg/kg de enxofre (S500) e 1.800 mg/kg de enxofre (S1800).

2.3 Misturas do diesel mineral com biodiesel

Misturas do diesel mineral com o biodiesel (Misturas Bx, sendo “x” a fração volumétrica do B100 na mistura) têm sido formuladas mundialmente. No Brasil, desde 2008, em função da Lei n. 11.097/2005, todo óleo diesel nacional disponível ao consumidor final deve ser acrescido de biodiesel.

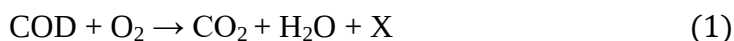
2.4 Biodegradação de poluentes orgânicos

Os produtos químicos, quando no meio ambiente, não devem atuar como agentes nocivos ou apresentar riscos para os seres vivos (animal e vegetal).

É de conhecimento público que a partir da revolução industrial, 1760, muitos compostos antropogênicos têm sido lançados em larga escala no meio ambiente aquático, solo e atmosférico. Pesquisas têm indicado que estes compostos são biodegradáveis, porém, uns apresentam alta biodegradabilidade (AB), outros, lamentavelmente, baixa biodegradabilidade (BD), como por exemplo, plásticos, corantes e pigmentos, que causam grande impacto ao meio ambiente e também no desenvolvimento da sociedade pós-moderna.

De acordo com a *European Comission* (CE) (2003), substâncias que apresentam o teor de biodegradação superior ou igual a 70% em 28 dias quando em testes específicos para se avaliar a biodegradação inerente, são consideradas como biodegradáveis, significando que apresentam potencial para biodegradação. Por outro lado, se o teor de biodegradabilidade for de 20 a 70%, essa substância é considerada parcialmente biodegradável com indicação da formação de subprodutos (metabólitos) estáveis (BEEK *et al.*, 2001). Portanto, é de extrema importância avaliar o comportamento ecológico dos compostos de descarte, no meio ambiente, através da investigação do grau de biodegradabilidade dos mesmos (PAGGA, 1997).

O ciclo das substâncias é um importante princípio nos sistemas ecológicos naturais complexos e técnicos, isto é, industriais (ex.: tratamento de água), devendo-se, traçar a evolução dos elementos químicos, como carbono, nitrogênio e fósforo. Os micro-organismos, bactérias e/ou fungos filamentosos, quebram as moléculas do “composto orgânico a ser degradado ou Composto Orgânico Dissolvido” em outras com estruturas moleculares mais simples (processo de biodegradação), que podem seguir quebrando-se em outras mais simples até atingirem, por fim, o nível químico (mineralização biótica). O metabolismo microbiano pode resultar na completa mineralização das moléculas orgânicas, isto é, sua conversão para CO₂, água, íons inorgânicos e energia (GAYLARDE *et al.*, 2005). A reação global do processo de mineralização biótica é representada pela Equação 1:



A biorremediação de poluentes orgânicos pode ser um processo espontâneo ou controlado, onde a degradação dos poluentes ocorre por catálise biológica (degradação bioquímica) através de reações bioquímicas mediadas por micro-organismos que transformam compostos quimicamente complexos em compostos mais simples, liberando apenas substâncias inertes, como dióxido de carbono e água (BHUPATHIRAJU *et al.*, 2002).

Segundo Delille (1998), as principais consequências a nível ambiental e socioeconômico dos vazamentos de óleo em sistemas aquáticos são a redução dos nutrientes essenciais (nitratos e fosfatos) por decompositores que utilizam o óleo como fonte de carbono; a redução da oxigenação devido ao processo biológico de degradação do óleo e ao aumento da biomassa microbiana. O Brasil vem intensificando estudos na área de biorremediação de solos, rios e mares, objetivando reduzir alguns impactos ambientais resultantes de derramamentos acidentais de óleo (ABBAS, 2003; SANTOS, *et al.*, 2007).

As técnicas de biorremediação mais estudadas atualmente incluem a bioestimulação, bioaugmentação e a atenuação natural (CETESB, 2007). Dentre o uso de bioestimulantes necessários a biorremediação, a biomassa de levedura é estudada para ser empregada com a finalidade de conciliar o uso de biosurfactantes eficientes, capazes de degradarem os compostos de uma maneira acelerada. Dentre os tipos de biomassa microbiana que podem ser utilizados em especial a *S. cerevisiae*, destaca-se

como uma fonte vantajosa, devido a sua baixa toxicidade e sua facilidade em ser obtida (ARAUJO & FREIRE, 2013).

A CETESB (2007) classifica a técnica de bioestimulação como sendo o crescimento de micro-organismos naturais presentes no local contaminado, estimulado através da introdução de oxigênio, nutrientes, substâncias para a correção do pH do meio e receptores de elétrons específicos para a degradação do ambiente contaminado, o que deve aumentar a população microbiana. Quanto maior for a população de micro-organismos presentes na área a ser remediada, mais rápido e eficiente será o processo de biorremediação. Os micro-organismos presentes podem ou não utilizar os hidrocarbonetos da contaminação como fonte de alimento e energia.

Caso ocorra um limite nas taxas de biodegradação, derivada da dificuldade dos micro-organismos nativos em degradar os poluentes, deve-se avaliar as necessidades físicas químicas para a atividade microbiana, buscando a adição de agentes externos estimulantes, como nutrientes, biossurfactantes e oxigênio (ASSUNÇÃO & ROHLFS, 2012). Além da fonte de carbono, outros elementos nutricionais são limitantes para o desenvolvimento dos micro-organismos, em especial fontes de nitrogênio e fósforo, cujas concentrações devem ser convenientemente ajustadas. Esses elementos são fundamentais para as funções vitais dos micro-organismos como na síntese de material genético (RNA e DNA) e proteínas, e para a geração de energia (ATP) conforme observado por ROGERS *et al.* (1995).

Como aponta Mariano (2006), estratégias de bioestimulação podem ocorrer, envolvendo a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes. Os micro-organismos necessitam, principalmente, de nitrogênio e fósforo para incremento de biomassa cuja composição do bioestimulante microbiano pode ser fonte de macro e micronutrientes nos processos de bioestimulação.

Ao contrário da biorremediação passiva, na bioestimulação há um acréscimo de nutrientes orgânicos e inorgânicos que visam estimular a atividade microbiana (JACQUES *et al.*, 2007). Vários nutrientes devem estar disponíveis no meio ambiente, pois os micro-organismos não dependem somente da energia do carbono. O nitrogênio e o fósforo são considerados fatores limitantes para a degradação microbiana, por isso são comumente utilizados na técnica de bioestimulação (BAPTISTA *et al.*, 2013). O nitrato é também um componente importante na bioestimulação, pois ele é utilizado por alguns micro-organismos em duas diferentes rotas metabólicas; como fonte de nutrientes no

metabolismo assimilativo ou como receptor de elétrons no metabolismo dissimilativo dos micro-organismos (COSTA *et al.*, 2009).

Hamme *et al.* (2003), mencionam que os micro-organismos com a capacidade de utilizar petróleo e seus derivados como fontes de carbono e energia são chamados de hidrocarbonoclásticos. Essa população microbiana possui em seu material genético, os genes específicos para a produção das enzimas que atuam no processo de biodegradação.

Moreira & Siqueira (2002) indicaram que vários contaminantes podem ser tratados biologicamente como: petróleo bruto, hidrocarboneto do petróleo, gasolina, óleo diesel, combustível de avião, preservativos de madeira, solventes diversos, ou outros compostos xenobióticos, existindo mais de 300 compostos individuais passíveis de destoxificação por biorremediação.

Gaylarde *et al.* (2005) relatam que as técnicas de bioestimulação demonstraram um aumento de 5 a 10 vezes nas taxas de degradação do contaminante. No entanto, existem dúvidas sobre os efeitos em longo prazo, uma vez que as taxas de degradação tendem a se equalizar com o tempo.

Segundo Baker & Herson (1994), as principais vantagens da biorremediação são:

- Pode ser feita no local;
- Mantém a ruptura mínima do sítio contaminado;
- Proporciona a eliminação de custos de transportes, poluentes de forma permanente e da persistência prolongada de determinados poluentes.

A biorremediação pode ser considerada fonte de controle e prevenção de poluição, reduzindo a toxicidade dos orgânicos e o potencial de migração de constituintes perigosos para o ambiente aquático, não oferecendo riscos ao ambiente, uma vez que, favorece a degradação de compostos poluentes e/ou tóxicos como hidrocarbonetos aromáticos a:

- Compostos com peso molecular menor apresentando maior polaridade;
- Em alguns casos pode conduzir a produção/formação de CO₂ e H₂O (mineralização);
- Concentrações dos poluentes originais podem ser reduzidas a níveis aceitáveis pelos órgãos de saúde, propiciando a recuperação da área contaminada.

Portanto, pode-se dizer que a bioestimulação visa recuperar áreas contaminadas mediante a biodegradação de substâncias contaminantes, estimulando o crescimento da população microbiana pela adição de nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação) e a inoculação de micro-organismos ou consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento), capazes de degradar o contaminante, cujo benefício é a mineralização do poluente, isso é, a transformação em gás carbônico, água e biomassa microbiana (PELCZAR *et al.*, 1997; BENTO *et al.*, 2003; TORTORA *et al.*, 2005). Além do mais, esta técnica baseia-se na premissa de que uma grande parte dos constituintes do produto seja prontamente degradável (FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2006).

Segundo Zhang *et al.* (1998), para que haja uma biorremediação efetiva de produtos de baixa degradabilidade, além das condições físicas e ambientais, é necessário que ocorra biodisponibilidade de um segundo substrato biodegradável (fonte de carbono), com baixíssima toxidez, de modo que seja possível seu consumo realizado primeiramente, dessa forma, favorecendo o aumento na concentração da biomassa microbiana. Esse processo é conhecido como biodegradação cometabólica, sendo especialmente significativa quando o composto químico a degradar seja altamente resistente, como no caso do petróleo e seus derivados.

A estrutura química dos poluentes orgânicos tem uma profunda influência quanto à velocidade dos micro-organismos metabolizarem estas moléculas, especialmente com respeito às taxas e extensão de biodegradação, pois, alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados, enquanto outros são recalcitrantes (não biodegradáveis). Geralmente, compostos ramificados e polinucleados são mais difíceis para degradar que moléculas monoaromáticas ou com cadeias simples, aumentando-se o grau de halogenação da molécula, diminui-se a biodegradabilidade (ALEXANDER, 1994). Hidrocarbonetos com baixo a médio peso molecular e álcoois são exemplos de compostos facilmente biodegradáveis.

Os compostos aromáticos de até três anéis são degradados mais facilmente, mas, há linhagens de micro-organismos capazes de degradar compostos com cinco ou mais anéis aromáticos que, em geral, se processa produzindo principalmente fenóis. Tipicamente a degradação bacteriana envolve a ação de uma dioxigenase que gera a formação de um diol, com subsequente clivagem e formação de um diácido. Os compostos aromáticos mais leves estão sujeitos à evaporação, e à degradação

microbiana no estado dissolvido. O ataque enzimático pode ser no substituinte alquil ou diretamente no anel (ROSATO, 1997).

Alguns aspectos devem ser considerados para o emprego da técnica em questão: a identificação e caracterização do poluente (qual sua disponibilidade no ambiente e acessibilidade à ação microbiana ou enzimática); estudo da microbiota local, verificação da presença de organismos capazes de degradar o poluente e quais as condições climáticas e nutritivas favoráveis ao crescimento desses; quantificação dos nutrientes disponíveis no ambiente; estudo prévio das prováveis rotas metabólicas e dos metabólitos secundários gerados pela biodegradação do poluente (que podem ter uma toxicidade maior que a substância inicial); tempo requerido para que ocorra todo o processo; e fatores econômicos (PEREIRA & LEMOS, 2015).

A degradação de poluentes hidrocarbonetos de petróleo (xenobióticos) apresenta micro-organismos primários capazes de metabolizar o substrato principal fornecido ao sistema e os secundários que não utilizam o substrato principal, porém, os produtos liberados pelos micro-organismos primários caracterizam o cometabolismo quanto à adição de culturas bacterianas mistas ou puras, que apresentem as vias metabólicas que permitam a rápida metabolização do contaminante.

O efeito tóxico de poluentes no meio ambiente pode ser minimizado através de processos de remediação, a ver:

- Processos Abióticos: Aqueles que envolvem métodos químicos ou físicos para a remoção dos poluentes, também ocorrendo naturalmente, ex.: remoção por neutralização, oxidação, precipitação, extração por solvente, adição de surfactantes, decomposição fotoquímica;
- Processos Bióticos ou Biorremediação: Aqueles que utilizam micro-organismos ou processos microbiológicos para degradar poluentes. Fazem parte da chamada “solução verde” para o meio ambiente. Os micro-organismos “quebram” os hidrocarbonetos de petróleo visando utilizá-los no seu metabolismo (PANDEY *et al.*, 2000).

A tecnologia da biorremediação é baseada em processos nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por populações microbianas que apresentam capacidade de modificar ou decompor poluentes orgânicos. Em geral, um composto orgânico quando é oxidado perde elétrons para um aceptor final de elétrons, que é reduzido (ganha elétrons). O oxigênio, co-substrato para a enzima dar início ao metabolismo dos hidrocarbonetos, comumente atua como aceptor final de elétrons para a geração de

energia quando presente e a oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular, respiração aeróbia heterotrófica (CORDAZZO, 2000).

O monitoramento da biorremediação intrínseca é baseado no acompanhamento da evolução temporal e espacial da concentração de indicadores geoquímicos (p.e., pH, Eh, concentração de oxigênio dissolvido (OD), temperatura e aceptores de elétrons) na água subterrânea cujos resultados desses, podem ser usados para identificar fatores para o controle da taxa de biodegradação, bem como identificar o processo microbiológico de respiração (aeróbia ou anaeróbia) em diferentes porções da pluma de hidrocarbonetos dissolvidos. A diminuição da OD na água e um aumento da concentração de CO₂ são indicativos de um processo aeróbio de biodegradação. Um declínio do potencial redox (Eh), de valores positivos para negativos, reflete a mudança de condições oxidantes (favoráveis aos micro-organismos aeróbios) para condições redutoras, melhores condições aos processos anaeróbios que são mais lentos que os aeróbios (BORDEN *et al.*, 1995). Além dos aceptores de elétrons, outras variáveis podem ser relacionadas a processos biológicos, como o pH e o potencial redox (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996; AZADPOUR-KEELEY *et al.*, 1999; WALT & McNAB, 1999; KAO & WANG, 2000; BHUPATHIRAJU *et al.*, 2002; RÖLING & VERSEVEL, 2002; SILVA *et al.*, 2002; CHEON & LEE, 2004).

Segundo Baker & Herson (1994) a atenuação natural limita o deslocamento dos contaminantes e, portanto, diminui a contaminação do meio ambiente, através do monitoramento do deslocamento da pluma, assegurando que os pontos receptores (poços de abastecimento de água, rios, lagos) não serão contaminados (CORSEUIL & MARINS, 1998).

As limitações da biorremediação natural são: o longo tempo necessário, o risco da pluma de contaminação não ser atenuada antes de atingir pontos de captação para abastecimento de água e a aprovação pelo órgão ambiental.

A biodegradação dos compostos orgânicos ocorre através de reações de oxidação-redução, em que os contaminantes (doadores de elétrons) são oxidados na presença de receptores de elétrons (O₂, NO₃⁻, Fe⁺³, SO₄⁻², CO₂), produzindo espécies reduzidas, conhecidas como subprodutos metabólicos (como acetato, propionato e butirato) e produtos finais (como H₂O, N₂, Fe⁺², S⁻², CH₄). A variação destes indicadores no ambiente indica a ocorrência de biodegradação dos contaminantes e identificam quais processos estão ocorrendo (WIEDEMEYER *et al.*, 1999).

A natureza do processo de biodegradação de um COD no ambiente aquático pode ser classificada como:

- Aeróbia – geralmente ocorrendo em água doce através de micro-organismos que consomem oxigênio, que é um co-substrato para a enzima iniciar o metabolismo da matéria orgânica e ao término, utilizá-lo comoceptor final de elétrons para a geração de energia;
- Anaeróbia – ocorre por micro-organismos que não utilizam oxigênio cujoceptor final de elétrons é uma molécula inorgânica que não o oxigênio ou, raramente, uma molécula orgânica.

Nos processos bióticos podem ser usadas as técnicas:

⇒ Método de bioestimulação: também denominada de tecnologia ativa de remediação. Os micro-organismos se nutrem de múltiplos compostos orgânicos pela adição de oxigênio, água e nutrientes ao meio ambiente contaminado para o desenvolvimento de seu metabolismo de manutenção e reprodução culminado na remoção do contaminante (MARIANO *et al.*, 2008). Os micro-organismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os poluentes como fonte de alimento. Contudo, os compostos oleosos são, supostamente, degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação da população de micro-organismos, causada pelo incremento dos níveis de nutrientes (SARKAR *et al.*, 2005). Os dois nutrientes essenciais ao crescimento celular são o nitrogênio e o fósforo, que devem estar balanceados, propiciando uma boa proporção com o teor de carbono. Silva (2012) concluiu que a relação C:N de 50:1 proporcionou uma maior degradação de hidrocarbonetos do óleo diesel pelas espécies microbianas selecionadas, confirmada pelo aumento gradual de biomassa, redução (acima de 69%) dos n-alcanos da faixa de C9 a C21 e diminuição da toxicidade (germinação acima de 65%). Hidrocarbonetos servem como fonte de carbono para micro-organismos, apresentando-se como um elemento vital para o crescimento e desenvolvimento destes. Entretanto outros macro e micronutrientes também são requeridos (ASSUNÇÃO; ROHLFS, 2012). Devido ao crescimento da população microbiana, pela adição nutricional, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais rapidamente na bioestimulação do que na atenuação natural monitorada (SARKAR *et al.*, 2005). A bioestimulação representa a adição de nutrientes com o intuito de estimular o crescimento dos micro-organismos de

ocorrência natural degradadores dos compostos químicos presentes (MROZIK & SEGET, 2010). O processo de bioestimulação consiste em introduzir nutrientes adicionais na forma de fertilizantes orgânicos e/ou inorgânicos na área contaminada, incentivando o crescimento de micro-organismos capazes de degradar os poluentes existentes no meio e, com isso, promovendo o aumento da população microbiana e consequentemente, uma degradação mais rápida do contaminante (DEON, 2012). Alexander (1994) reporta valores que variam de 50:1 a 400:1, enquanto Baker & Herson (1994) propuseram relações de C:N na faixa de 10:1 a 200:1. Walworth *et al.* (1997) sugerem um estudo acurado dos níveis críticos de nitrogênio para encontrar os mais adequados a fim de suprir as necessidades nutricionais do micro-organismo com respeito a este elemento, sem que ocorra a inibição do crescimento microbiano. Aumentos na concentração de nitrogênio, favorece a biodegradação, e consequentemente, maior produção de ácidos intermediários (ATLAS, 1984). Os micro-organismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os hidrocarbonetos como fonte de alimento. Contudo, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação da população de micro-organismos, causada pelo implemento dos níveis de nutrientes (SARKAR *et al.*, 2005). O bioestímulo favorece a reprodução microbiana e suas atividades metabólicas, ao meio ambiente contaminado e assim possibilita o aumento das taxas de biodegradação que é frequentemente empregada em projetos de biorremediação (ATLAS, 1997). Para se utilizar o processo de bioestimulação, deve-se demonstrar que existe no local contaminado uma população natural de micro-organismos capazes de biodegradar os contaminantes presentes e que as condições ambientais se são insuficientes para se obter altas taxas de atividade microbiológica dessa população (MARIANO, 2006). Durante o bioestímulo existem fatores limitantes como nutrientes e aceptores de elétrons que estimulam o metabolismo e a velocidade de crescimento dos degradadores o que acelera as taxas de biodegradação em condições ambientais favoráveis. A adição de nutrientes em ambientes contaminados permite a degradação mais rápida e eficaz dos hidrocarbonetos por parte dos micro-organismos nativos (VALLEJO *et al.*, 2005).

⇒ Método do bioaumento: aumento da população microbiana pela adição de micro-organismos endógenos (nativos) adaptados às condições do contaminante a ser tratado (BAPTISTA, 2013).

A biorremediação pode ser classificada (GOMES, 2004) ainda em:

- Biorremediação *in situ* (no local): é realizada no próprio local, sem que haja remoção de material contaminado, onde houve o derramamento, tendo os micro-organismos presentes no sítio poluído conduzindo o processo de biodegradação, ex.: bioventing (oxigênio é injetado em solo contaminado, ao ser difundido na matriz porosa, estimula o crescimento e a atividade microbiana nativa);
- Biorremediação *ex situ* (fora do local): o material contaminado é levado para outra área onde é feita a biodegradação do poluente, ex.: processos que ocorrem em biorreatores, compostagem, aterros (landfarming).

Os fatores ambientais que afetam a biodegradação do carbono orgânico dissolvido:

- Disponibilidade de oxigênio dissolvido uma vez que em condição aeróbia a taxa de biodegradação é maior;
- Presença de matéria orgânica;
- Disponibilidade de nutrientes (fosfatos, sulfatos, nitratos, etc), baixa concentração de vitaminas, aminoácidos, vitaminas lipossolúveis;
- Oxigênio, para a rápida oxidação dos hidrocarbonetos e outros compostos do petróleo;
- Contato óleo-água, devido à relativa insolubilidade do óleo na água, tal contato controla a velocidade de oxidação e da degradação;
- Condições de umidade para facilitar as reações;
- Temperatura - ideal para processos de biodegradação: 20 a 35°C;
- pH, aeração;
- Presença de compostos inibitórios;
- Salinidade e atividade de água.

O limite de disponibilidade de muitos poluentes para os micro-organismos é um dos principais fatores que afetam a biodegradação desses. Assim, mesmo que existam micro-organismos em quantidades suficientes e que as condições ambientais (pH, temperatura, etc) estejam adequadas, a biodegradação dos compostos poluentes ocorrerá apenas até o limite imposto pela disponibilização dos mesmos (RAIMUNDO & RIZZO, 2002).

De acordo com Cardoso (1992), os micro-organismos não dependem apenas da energia e do carbono, mas, de inúmeros elementos como o nitrogênio que é essencial para o processo de biorremediação, por estar intimamente relacionado ao metabolismo dos micro-organismos. O nitrogênio pode ser utilizado para o crescimento celular (NH_4 ou NH_3) sendo facilmente assimilado pelo metabolismo microbiano, estimulando a biodegradação dos contaminantes.

A grande maioria dos estudos encontrados na literatura aborda sobre a:

- Seleção de micro-organismos portadores de potencial de biodegradação do B100; (VIEIRA & SILVA 2006; MARIANO *et al.*, 2008);
- Avaliação da degradabilidade do B100, óleo diesel e do impacto da presença do B100 na biodegradação do óleo diesel citada por Zhang *et al.* (1998) foi mais abrangente, uma vez que avaliaram também a evolução da concentração dos substratos e perfis dos subprodutos da biodegradação ao longo do processo.

2.5 Bioquímica da biodegradação

Nos processos de degradação biológica de substratos orgânicos, a cinética das reações envolvidas na metabolização das moléculas, é função, entre outras, do tamanho das cadeias de carbono presentes, do número de ramificações e insaturações constituídas na molécula e da complexidade estrutural da mesma. Sendo assim, os ácidos graxos, compostos por longas cadeias alquílicas, contendo insaturações, são mais facilmente metabolizados por processos naturais biológicos do que àqueles de cadeias de mesmo tamanho, contendo apenas ligações carbono-carbono saturado (C-C) simples (gordura animal). Geralmente, as ligações insaturadas de compostos orgânicos são mais facilmente lipases produzidas oxidadas por bactérias do que as saturadas, uma vez que, as forças que envolvem uma ligação insaturada são menores (SAWYER *et al.*, 1994).

Ácidos orgânicos servem como nutriente para muitos micro-organismos sendo oxidados a dióxido de carbono e água cuja taxa de oxidação aumenta na presença de ligações insaturadas. A taxa de ataque biológico sobre ácidos graxos de alta massa molecular é frequentemente limitada pela sua solubilidade em água (SAWYER *et al.*, 1994).

A oxidação dos ácidos graxos até o estágio de acetil-CoA (β -oxidação) proveniente de carboidratos é completamente oxidada a CO_2 e H_2O pela ação de enzimas. A velocidade global do catabolismo (fase degradativa do metabolismo),

liberador de energia é controlado pelas necessidades celulares de energia, na forma de ATP e de NADPH, e não pela simples disponibilidade ou concentração de combustíveis tissulares (LEHNINGER,1997; MURRAY *et al.*,2002).

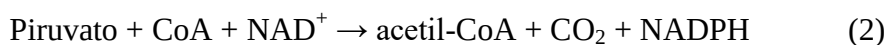
O metabolismo aeróbio microbiano da degradação oxidativa do biodiesel consiste de uma série de reações enzimáticas consecutivas interligadas que é a via final de oxidação de carboidratos, lipídeos e proteínas, acarretando o catabolismo de resíduos de acetil (acetil-CoA), um éster da coenzima A, liberando equivalentes redutores sob a forma de hidrogênio ou de elétrons que, após a oxidação, conduzem a liberação e captação, sob a forma de ATP, da maior parte da energia disponível dos combustíveis tissulares; nela as moléculas orgânicas são degradadas por reações consecutivas em produtos finais menores e mais simples (LEHNINGER,1997; MURRAY *et al.*, 2002).

Existem três estágios principais no catabolismo aeróbio dos lipídeos:

Estágio 1: as macromoléculas celulares (triglicerídeos) são degradadas em suas unidades fundamentais pela ação de enzimas (lípases), presentes na membrana mitocondrial externa dos micro-organismos; assim, os lipídeos são degradados em ácidos graxos, glicerol e outros componentes.

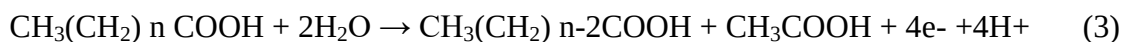
Estágio 2: os produtos formados no estágio 1 são reunidos e convertidos em número menor de moléculas mais simples como o glicerol do estágio 1 que é degradado a um intermediário único com 3 átomos de carbono, o piruvato, o qual é então convertido em uma unidade de 2 átomos de carbono, o grupo acetil da acetil-coenzima A. De forma similar os ácidos graxos são quebrados em grupos acetil para formar o acetil-CoA como produto final do estágio 2, iniciando a descarboxilação oxidativa do piruvato pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase, o grupo carboxila é removido como uma molécula de CO₂ e o grupo acetil aparece como acetil-CoA. Os dois hidrogênios removidos do piruvato aparecem como NADH e H⁺. O NADH transfere seus elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, que os transporta até o oxigênio molecular. A desidrogenação e a descarboxilação combinadas do piruvato a acetil-CoA envolve a ação sequencial de enzimas diferentes, a piruvato desidrogenase, a diidrolipoil transacetilase e a diidrolipoil desidrogenase, bem como as coenzimas: tiamina pirofosfato (TPP), flavina adenina dinucleotídeo (FAD),

coenzima A (CoA), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e ácido lipóico, organizadas em um complexo multienzimático, representado pela Equação 2:



Estágio 3: apresenta função complementar para degradação das moléculas geradas no estágio 2, o grupo acetil do acetil-coenzima A, é introduzido no *ciclo de Krebs*, via final comum da degradação oxidativa dos ácidos graxos nas células aeróbias, através do qual a maioria dos nutrientes fornecedores de energia são oxidados a apenas dois produtos finais, CO_2 e H_2O .

A oxidação de substâncias graxas insaturadas procede a diferentes velocidades, dependendo do número e da posição alílica das duplas ligações (KNOTHE, 2007). Os Ácidos Graxos de Cadeia Longa (AGCL) dentro das células microbianas são incorporados a complexos lipídicos, ou catabolizados para a formação de compostos de baixa massa molar (CO_2 , CH_4 e H_2O). As etapas determinantes para a oxidação desses ácidos envolve uma série de quatro reações catalisadas por enzimas que clivam dois átomos de carbono por vez, a partir do terminal carboxílico de um ácido graxo. Essa série de reações é repetida para o encurtamento da cadeia do ácido graxo e continua até que todo o ácido seja degradado a acetil-CoA, que se converte em ácido acético e, posteriormente, em compostos de baixa massa molar, como produtos finais. A reação de degradação dos ácidos graxos é denominada de β -oxidação cuja equação está ilustrada na Equação 3:



Para cada molécula de AGCL degradada, é formada uma molécula de ácido graxo com dois átomos de carbono a menos, e uma de ácido acético, liberando quatro elétrons e quatro íons hidrogênio. Esses elétrons são transportados por aceptores no interior das células microbianas como flavina-adenina-dinucleotídeo (FADH) e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH) e utilizados para a formação de duas moléculas de gás hidrogênio, como apresentado pela Reação 4:



O hidrogênio formado é, então, utilizado por algumas espécies de micro-organismos que não sofrem inibição pelos AGCL.

Novak & Carlson (1970) observaram que o mecanismo de β -oxidação converteu, sequencialmente, ácidos graxos saturados como esteárico (C18:0) para ácidos palmítico (C16:0), mirístico (C14:0), láurico (C12:0), cáprico (C10:0) e outros como produto final. Na biodegradação de uma amostra contendo ácidos linoleico, oleico, esteárico, palmítico e mirístico, esses pesquisadores observaram que os ácidos: láurico, cáprico, caprílico (C8:0) e butírico (C4:0) foram detectados, em menores concentrações se comparados com o ácido acético, não sendo detectada a presença de ácido capróico (C6:0). Os ácidos caprílico, capróico e butírico foram detectados em estudos realizados por Rinzema *et al.* (1994) na degradação de ácido cáprico. Nas etapas de degradação anaeróbia do ácido linoléico, foi detectada a formação do ácido oleico (C18:1), o que mostra que o ácido linoleico antes de sofrer a reação de β -oxidação foi hidrogenado, reduzindo o número de insaturações. Em seguida, o ácido oleico foi degradado para a formação do ácido palmitoleico e, posteriormente, ácido palmítico. Os ácidos, palmítico e mirístico foram degradados em concentrações estequiométricas, equivalentes a 85-93% molar de ácido linoleico adicionado. Esses pesquisadores concluíram que esses ácidos permaneceram recalcitrantes por um período de 60 dias.

O estudo do efeito da inibição dos ácidos graxos sobre bactérias mostrou que depende do tipo de micro-organismo, pois as espécies gram-positivas são mais vulneráveis, quando comparadas com as gram-negativas (NIEMAN, 1954). O comprimento da cadeia carbônica e o número de insaturações presentes nos ácidos graxos também são parâmetros de inibição para os micro-organismos (KOMATSU *et al.*, 1991). Ácidos graxos saturados com 12-14 átomos de carbono e ácidos insaturados com 18 carbonos apresentam elevado grau de inibição (NIEMAN, 1954).

2.6 Biodegradação do diesel mineral

O meio ambiente tem sido poluído por produtos da indústria petrolífera e de seus derivados refinados por falhas no transporte e armazenamento e por operação de lavagem de tanques de navio. Embora sendo mais agressiva, a contaminação ambiental provocada pelo diesel, à formação de uma película sobre a água pode transmitir qualidades indesejáveis as águas, afetando o seu uso (PEREIRA & MUDGE, 2004).

A biodegradabilidade dos combustíveis baseados no petróleo depende da sua composição, sendo o óleo diesel constituído de muitos compostos recalcitrantes ao ataque microbiano. A biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo é um processo complexo que depende da natureza e quantidade de óleo ou hidrocarbonetos presentes. Além disso, o crescimento de micro-organismos sobre hidrocarbonetos apresenta problemas particulares, pois estes são imiscíveis em água (KOCH *et al.*, 1991; BENINCASA *et al.*, 2002). Geralmente se aceita que o mecanismo inicial de ataque para a degradação de alcanos é mono terminal, que procede da seguinte forma: alcano → álcool → aldeído → ácido graxo → acetato (SINGER & FINNERTY, 1984). As velocidades de biodegradação desses compostos estão estreitamente relacionadas com as estruturas químicas na seguinte ordem de decréscimo de susceptibilidade: n-alcanos > alcanos insaturados (presença de duplas e triplas ligações dificulta a biodegradação) > aromáticos de baixa massa molecular > ciclo alcanos > aromáticos de alta massa molecular (hidrocarbonetos com cadeia, possuindo mais que 9 átomos de carbono) (LEAHY & COLWELL, 1990; VIEIRA *et al.*, 2006).

Segundo Videla (1994) os metabolitos ácidos provenientes do metabolismo microbiano do óleo diesel têm sido apontados como um fator que reduz o pH da fase aquosa.

Na biodegradação de hidrocarbonetos é essencialmente uma reação de oxirredução onde o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétrons) e um acceptor de elétrons [oxigênio (O_2), nitrato (NO_3^-), óxidos de ferro [$Fe(OH)_3$], sulfato (SO_4^{2-}), água (H_2O) e dióxido de carbono (CO_2) é reduzido.

A seguinte sequência de preferência de utilização desses aceptores é: oxigênio > nitrato > óxidos de ferro > sulfato > água, que reflete a diminuição do potencial de oxidação dos aceptores. Em geral, a cinética de oxidação dos hidrocarbonetos é mais rápida para aceptores de elétrons com potenciais de oxidação mais elevados (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996).

Os hidrocarbonetos consistem, essencialmente, em átomos de carbono e hidrogênio variando desde moléculas mais simples e mais facilmente biodegradáveis, como o metano, até compostos mais complexos, como os que incluem anéis de benzeno (MOURA & SAMARA, 2006).

Estudos de biodegradação têm demonstrado que algumas populações microbianas podem degradar frações alifáticas e aromáticas de hidrocarbonetos simultaneamente, embora a adição de determinados compostos e a composição de

algumas misturas podem interferir na degradação dos componentes (OLSON *et al.*, 1999).

De acordo com Bartha (1996), diferentes frações de derivados de petróleo ocupam posições intermediárias de recalcitrância variando desde os mais degradáveis até os moderadamente recalcitrantes. No entanto, estudos têm revelado que o petróleo bruto e seus derivados podem agir como substratos para o crescimento microbiano. Alteram a concentração da densidade microbial do sistema aquático, de acordo com sua concentração, pH e areação do meio. Dependendo do teor de óleo presente no meio aquático podem ocorrer os seguintes fatos:

- Em pequenas quantidades (baixa poluição), o óleo favorece o crescimento da população microbiana porque os hidrocarbonetos podem ser utilizados como uma fonte de nutrientes;
- Em elevadas quantidades de poluição de óleo, o número de micro-organismos decresce.

Quase todos os hidrocarbonetos do petróleo são biodegradados sob condições aeróbias, geralmente a maior limitação na biodegradação aeróbia em superfície é a baixa solubilidade do oxigênio em água. Por exemplo, a mineralização aeróbia do tolueno ($C_6H_5-CH_3$) é representada pela seguinte Equação 5:



A extensão da biodegradação aeróbia é controlada pela quantidade de contaminantes, a taxa de transferência de oxigênio para a sub superfície e o conteúdo original de oxigênio no aquífero (BORDEN *et al.*, 1995).

De acordo com Kennish (1997), os alcanos de baixo peso molecular degradam-se rapidamente (em até uma semana), enquanto que os hidrocarbonetos de elevado peso molecular (alifáticos e aromáticos) sofrem degradação lenta.

A biodegradação dos hidrocarbonetos pode ocorrer numa faixa de temperatura elevada (SORKHOH *et al.*, 1993). De modo geral, à baixa temperatura, a viscosidade do óleo aumenta, a volatilização dos alcanos de cadeia curta é reduzida, o que leva a um processo de biodegradação mais lento.

Apesar das bactérias serem, provavelmente, as maiores responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos no ambiente, leveduras e 27 gêneros de fungos filamentosos também degradam hidrocarbonetos no ambiente marinho (FLOODGATE,

1984). O gênero *Pseudomonas*, relacionado com biodegradação de hidrocarbonetos (SOLANO-SERENA *et al.*, 2000), é considerado um dos gêneros metabolicamente mais versátil, capaz de persistir por mais tempo na água e tende a resistir aos agentes cáusticos do ambiente por mecanismos ainda desconhecidos. A *Pseudomonas aeruginosa* tem sido aplicada em processos de degradação do etanol e do BTEX na gasolina comercial Teixeira & Bento (2007), gasolina, óleo, diesel e óleo cru Karamalidis *et al.* (2010), entre outros.

A taxa de degradação de hidrocarbonetos por micro-organismos é limitada por fatores como: temperatura, umidade, concentração do contaminante, oxigênio, nitrogênio e de fósforo, aclimatação ou mesmo adaptação ao contaminante (LI *et al.*, 2000).

A biodiversidade dos micro-organismos permite a sua sobrevivência em diversos *habitats*, dentre esses, as bactérias formam o grupo com maior diversidade fisiológica, proporcionando maior adaptabilidade sendo possível selecionar, dentro de certos limites, organismos tolerantes a diversos fatores estressantes (SIQUEIRA *et al.*, 1994).

Como exemplo das potencialidades de micro-organismos na degradação de compostos recalcitrantes, Robles *et al.* (2000) afirmaram que várias espécies de *Penicillium* degradaram ligninas e outros compostos aromáticos e fenólicos. Richard & Vogel (1999) utilizando um consórcio bacteriano para degradação de óleo diesel, constataram que 90% dos hidrocarbonetos do óleo diesel foram degradados após 50 dias de experimento.

Kataoka (2001) realizou estudo visando o isolamento de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos para promover o processo de biorremediação e a problemática relacionada aos acidentes com derivados do petróleo. Segundo Rosato (1997) bactérias, algas, leveduras, fungos filamentosos e protozoários apresentam espécies capazes de degradar hidrocarbonetos sendo em sua maioria mesófila e aeróbia, uma vez que a degradação de hidrocarbonetos envolve uma reação de oxidação e o metabolismo desses compostos ocorre numa faixa de temperatura entre 30 e 40°C.

2.7 Biodegradabilidade de biodiesel e das Misturas Bx

Dentre os combustíveis derivados de petróleo, o diesel é um dos mais suscetíveis à presença de sedimentos de origem biológica e química, e a adição do biodiesel agrava mais essa condição. Estudos demonstram que quanto maior o teor de biodiesel, maior

será a biodegradabilidade, que ocasionará alteração nas propriedades físicas e químicas, com a produção de sólidos visíveis. Desde a adição obrigatória do biodiesel ao diesel, o mercado tem relatado uma série de problemas relacionados à mistura, que se intensificaram com a adição de 5% de biodiesel ao diesel. Dentre os principais problemas estão o entupimento de filtros, o surgimento de borras, a proliferação de bactérias e a necessidade de manutenções mais frequentes, além da rápida degradação do combustível.

Micro-organismos são agentes transformadores eficazes, em face de sua habilidade em degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas, comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias e indústrias. Por assimilarem tais substâncias como fonte de carbono e/ou de energia, mais de 70 gêneros microbianos vêm sendo empregados na resolução de problemas ambientais, capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono segundo, Atlas (1984) e Ururahy *et al.* (1998) dentre esses os que têm sido apontados na literatura como potencialmente biodegradadores dos B100 e diesel são:

- Bactérias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovarans*, *Pseudomonas gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Marinomonas vaga* (FOLLIS, 1994; VIEIRA *et al.*, 2016);
- Leveduras: *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces* e *Rhodotorula* são degradadores de uma mistura de hidrocarbonetos (ZHANG *et al.*, 1998; LEUNG *et al.*, 2005);
- Fungos filamentosos: *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* Ziino *et al.* (1999) e *Aspergillus versicolor* (PEREIRA & MUDGE, 2004).

Vários autores enfatizam que a adaptação da cultura microbiana ao poluente é um fator preponderante no processo de biodegradação. Micro-organismos isolados de ambientes com histórico de poluição por hidrocarbonetos de petróleo tem maior habilidade para degradar tais poluentes (ENGLERT & KENZIE, 1993; KILBANE II *et al.*, 2000).

A maior parte dos componentes do petróleo (de 60% a 90%) é biodegradável no entanto, o restante é recalcitrante. O destino destes compostos após um derrame irá depender da interação entre vários fatores, podendo se destacar a degradação microbiana (CRAPEZ *et al.* 2002).

Poucos estudos têm sido realizados sobre a biodegradação do B100 em ambiente aquático e como esse combustível afetaria a degradação do diesel nesse ambiente. De acordo com Zhang *et al.* (1998), o B100 pode promover e acelerar a biodegradação aeróbia do diesel em misturas aquosas, contendo nutrientes (fontes dos minerais N, K, P, Zn, Mg, Mn, Fe) por meio do processo biológico conhecido como cometabolismo isto é, aquele em que os micro-organismos usam um segundo substrato que apresente elevada biodegradabilidade (no caso: B100), como fonte de carbono, para degradar o primeiro substrato de baixa biodegradabilidade (no caso: diesel), sendo a taxa de biodegradação do diesel diretamente proporcional à fração volumétrica do B100 na mistura.

A provável rota para a degradação do biodiesel consiste na seguinte sequência de eventos:

- Clivagem do metil éster por uma esterase, produzindo ácido graxo e o álcool associado;
- Quebra do ácido graxo pelo metabolismo respiratório ou incorporação direta nos lipídeos celulares (LEHNINGER, 1997).

Certos micro-organismos tais como *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Marinomonas vaga*, *Escherichia coli*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus subtilis*, apresentam potencial para a degradação do B100.

Os ésteres alquílicos presentes no B100 possuem relativamente elevado número de octanas e são considerados uma alternativa biodegradável aos compostos oxigenados recalcitrantes da gasolina (LIU & SULFITA, 1994). Entretanto, desde que o B100 seja comparado aos ácidos graxos, do que aos alcanos e compostos aromáticos de elevado peso molecular, que constituem o diesel de petróleo, observou-se que as bactérias demonstraram potencial para a sua degradação muito mais facilmente do que ao diesel de petróleo (FOLLIS, 1994).

Em comparação com o diesel, o B100 é um combustível com maior biodegradabilidade, apresentando um percentual de degradabilidade de aproximadamente, 98% em 21 dias de processo (ZHANG *et al.*, 1998; DEMELLO *et al.*, 2007).

O gênero *Pseudomonas* é bastante citado na literatura, como um dos gêneros que tem potencialidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo assim como, resultou da

seleção de isolados mais promissores pelo uso da técnica do indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol-DCPIP (ROCHA, 2011).

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

Demello *et al.* (2007) compararam a velocidade de degradação entre diesel fóssil e B25 (25% de biodiesel misturado ao diesel), em um ambiente marinho, e verificaram que a degradação dos ésteres de ácidos graxos e dos n-alcanos ocorre simultaneamente, e mais rapidamente do que outros componentes do diesel.

Prince *et al.* (2008), em estudo sobre a biodegradação aeróbia da mistura binária B20, verificaram que metil-ésteres de ácidos graxos foram degradados a uma velocidade semelhante dos n-alcanos presentes no óleo diesel, verificando-se uma relação entre a degradação dos ácidos graxos e hidrocarbonetos.

Pasqualino *et al.* (2006) relataram um aumento na biodegradabilidade das misturas de diesel e biodiesel, à medida que mais biodiesel era adicionado assim como, um efeito positivo na biodegradação das misturas, o biodiesel ao ser adicionado no diesel, aumentou a biodegradabilidade do diesel, através do cometabolismo. As transformações cometabólicas são processos em que os micro-organismos utilizam primeiramente um segundo substrato (mais acessível) como fonte de carbono, e em seguida utiliza o substrato principal (mais recalcitrante), que será atacado somente quando for a única fonte de carbono disponível. Zhang *et al.* (1998) observaram o cometabolismo na biodegradação de misturas de diesel e biodiesel, na presença de ésteres de ácidos graxos, a taxa de degradação do diesel aumentou três vezes, quando comparada a tratamentos, em que o diesel era a única fonte de carbono. Um aumento de 26% foi verificado na biodegradação do biodiesel puro por Owsianiak *et al.* (2009).

Schleicher *et al.* (2009) verificaram um maior crescimento de micro-organismos em misturas com 20% de biodiesel de soja (B20), seguido pela mistura B5, e por último o B100.

2.7.1 Cinética de Biodegradação

Estudar a cinética de biodegradação de compostos orgânicos possibilita estimar a persistência dos contaminantes no ambiente e prever a variação de suas concentrações no tempo. As reações de biodegradação dos compostos orgânicos dissolvidos ocorrem em velocidade específica para cada composto. Os modelos mais comuns usados para descrever a biodegradação de compostos orgânicos incluem o decaimento de primeira ordem, a cinética de Monod e a cinética de reações instantâneas (BEDIENT, 1997).

O modelo cinético de primeira ordem é o modo mais apropriado para representar a biodegradação de compostos orgânicos. A expressão comumente usada para a representação da biodegradação de primeira ordem envolve o uso de uma relação de decaimento exponencial representada pela Equação 6:

$$\frac{C}{C_0} = e^{-\lambda t} \quad (6)$$

Onde C é a concentração de biodegradação do contaminante, C₀ é a concentração inicial e λ é o coeficiente de decaimento do soluto devido à biodegradação. Através do gráfico ln(C) versus tempo t, obtém-se uma reta, cujo coeficiente angular corresponde ao coeficiente de biodegradação de primeira ordem (λ) (CHAPRA, 1997).

O modelo cinético de primeira ordem, mostrado na Equação (6) assume que o coeficiente de biodegradação do soluto é proporcional à sua concentração. Um aumento na concentração, origina aumento na cinética de degradação (BEDIENT, 1997).

As cinéticas de primeira ordem são frequentemente expressas em termos de tempo de meia vida do composto. O tempo de meia vida (t_{1/2}) do contaminante é definido como o tempo necessário para reduzir a concentração inicial a 50% (BEDIENT, 1997). A expressão (7) do tempo de meia-vida para a reação de primeira ordem é dada por:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda} \quad (7)$$

2.8 Degradabilidade oxidativa do biodiesel

A degradabilidade por Processos Oxidativos Avançados (POA) se caracterizam por transformar a grande maioria dos contaminantes orgânicos em dióxido de carbono, água e ânions inorgânicos, através de reações de degradação que envolvem radicais oxidantes transitórios, principalmente os hidroxila. São processos limpos e não seletivos, podendo degradar inúmeros compostos, independentemente da presença de outros. Além disso, podem destruir compostos orgânicos em fase aquosa, gasosa ou adsorvidos numa matriz sólida.

Os POA têm recebido grande interesse no tratamento e pré-tratamento de compostos não biodegradáveis em águas, emissões atmosféricas e solos contaminados, pois podem converter a matéria orgânica em dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) ou, no caso de pré-tratamentos, tornar esta matéria biodegradável (ALLOUI; KCHAOU; SAYADI, 2009; MORAIS; ZAMARA, 2005).

Os processos que contam com a presença de catalisadores sólidos são chamados heterogêneos, enquanto que os demais são denominados homogêneos.

Nos sistemas homogêneos, onde não existe a presença de catalisadores na forma sólida, a degradação do poluente orgânico pode ser pelo mecanismo da fotólise direta com ultravioleta (UV) onde a luz é a única fonte capaz de produzir a destruição do poluente.

O biodiesel é mais suscetível ao processo de oxidação que o diesel fóssil convencional, principalmente devido às diferenças na estrutura química de ambos, como a presença de duplas ligações nos ésteres componentes do biodiesel.

O processo oxidativo do biodiesel é favorecido por fatores tais como temperaturas elevadas, presença de luz ou materiais estranhos como metais ou iniciadores. A natureza dos radicais também tem influência nos produtos observados e a geometria da dupla ligação pode também influenciar.

O oxigênio molecular com o qual o radical do éster do ácido graxo reage existe sob duas formas podendo ocorrer dois mecanismos de oxidação, auto oxidação (ou oxidação térmica) e foto-oxidação.

A foto-oxidação é mais rápida comparada a auto oxidação, isto porque a reação do oxigênio tripleto com o éster do ácido graxo é limitada devido à restrição de spins. O processo de auto oxidação normalmente exibe um tempo de indução durante o qual a reação global é lenta, seguido por uma etapa mais rápida.

O processo de degradação oxidativa do biodiesel pode ser ativado pela luz, ou seja, está sujeito a degradação por foto-oxidação. Este tipo de oxidação é um mecanismo que envolve a adição direta de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) aos ácidos graxos insaturados. O oxigênio singlete reage diretamente com as duplas ligações presentes no óleo, produzindo hidroperóxidos (FERRARI & SOUZA, 2009).

Segundo Dantas (2010), a radiação UV tem sido aplicada com êxito no tratamento da água em processos de desinfecção e degradação de contaminantes orgânicos por fotólise direta.

2.9 Toxicidade

Testes de toxicidade são ferramentas desejáveis para avaliar a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes, uma vez que somente as análises físico-químicas tradicionalmente realizadas, tais como demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos, concentrações de metais e de outras substâncias de caráter orgânico ou inorgânico, cujos limites encontram-se estabelecidos nas legislações ambientais, não são capazes de distinguir entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente e, por isso, não são suficientes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes. Apesar disso, os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais. Enquanto, as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. Assim, as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam.

A vulnerabilidade do ambiente aquático às substâncias químicas depende: das propriedades físicas e químicas dos contaminantes e dos produtos resultantes de sua transformação; da concentração dos contaminantes no ecossistema; da duração e do tipo de descarga dos contaminantes (descarga intermitente ou contínua); das propriedades do ecossistema que lhe permitem resistir às alterações resultantes da presença dos contaminantes, como a capacidade tamponante das águas e a concentração de matéria orgânica dissolvida nelas e, da localização do ecossistema em relação ao sítio de lançamento dos contaminantes.

A toxicidade é uma propriedade que reflete o potencial de uma substância em causar um efeito danoso a um organismo vivo, que depende da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto e do tempo de

exposição (RAND, 2000). Os testes com substâncias específicas são realizados com o propósito de obter informações para registros químicos. Enquanto, que os testes com águas contaminadas e efluentes são utilizados para verificar se há concordância dos valores obtidos com os padrões permitidos (KLAASSEN, 2001).

A germinação se caracteriza como uma sequência de eventos fisiológicos, influenciada, principalmente, pela água. Por meio da absorção de água, a respiração e demais atividades metabólicas são intensificadas. Assim, se a água estiver contaminada, todo o processo germinativo será ameaçado. Isso faz com que o grau de germinação de certas espécies sensíveis, na presença de contaminantes potencialmente tóxicos, possa ser utilizado como um indicador da toxicidade de tal contaminante (GARCIA, 2006).

O efeito tóxico causado em ambientes poluídos pode ser avaliado por testes de toxicidade, utilizando sementes de vegetais, que atuam como bioindicadores, que se destaca por ser uma metodologia simples, de baixo custo, rápida, segura e reproduzível.

Para Magalhães & Ferrão-Filho (2008), os testes são realizados com organismos indicadores, que apresentam baixa tolerância quando expostos a determinados poluentes, apresentando modificações fisiológicas, morfológicas ou comportamentais.

Nos bioensaios, os organismos testes utilizados podem ser agrupados em: micro-organismos, plantas e peixes (RIZZO, 2011). Muitas espécies de plantas, incluindo repolho, cebola, tomate, pepino, cevada e alface têm sido utilizadas nos testes de germinação e crescimento das raízes (NASSIF *et al.*, 1998). Ao utilizar os organismos relevantes, tais como peixes, *Daphnia*, ratos, pássaros e sementes (Stine & Brown 1996; Landis & Yu, 1995; Mariano 2007), pode-se calcular e avaliar um limite tolerável dos compostos químicos. O metabolismo, transporte de nutrientes e divisão celular das sementes durante os estágios iniciais do desenvolvimento são diretamente influenciados pelas condições do meio.

A semente de alface (*Lactuca sativa*), denominada de organismos teste, é uma das espécies de plantas recomendada para teste padrão de toxicidade (USEPA, 1996), por ser facilmente obtida e por oferecer resultados rápidos e fáceis de serem avaliados (GARCIA, 2006) como parte da avaliação do potencial de contaminação de resíduos e efluentes dispostos no ambiente (OECD, 1984; USEPA, 1996).

Segundo Wang & Keturi (1990), os testes de toxicidade usando *Lactuca sativa* são eficazes por esse organismo ser sensível e possuir alta taxa de germinação. Os organismos teste podem sofrer efeitos adversos quando em contato com substâncias tóxicas que pode incluir desde alterações genéticas, imobilidade, deformidades até

letalidade (PIMENTEL *et al.*, 2011). Tanveer *et al.* (2013) e Cruz *et al.* (2013) concluíram que sementes menores apresentam-se mais sensíveis ao estresse ambiental, constatando-se que sementes maiores oferecem maior proteção quando expostas a um contaminante.

Flohr *et al.* (2005) realizaram testes para determinar a toxicidade de compostos químicos, efluentes líquidos e percolados de resíduos sólidos e estabeleceram limites máximos para lançamentos de descarte de contaminantes e para o monitoramento ambiental (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Esses testes baseiam-se na exposição de organismos representativos do ambiente submetidos a concentrações de substâncias a serem avaliadas ou a fatores ambientais em um determinado espaço de tempo, a fim de observar os efeitos que essa substância causa sobre suas funções biológicas fundamentais como o seu crescimento, desenvolvimento, às mutações ou até mesmo a morte (COSTA, 2010). Esses efeitos podem se diferenciar entre agudos e crônicos. Estes testes são realizados para avaliar comparativamente a toxicidade de substâncias, cuja diferença consistiu no tempo de exposição do organismo em relação ao contaminante.

Tamada *et al.* (2013) estudaram os níveis toxicológicos da biodegradação dos contaminantes (óleo mineral lubrificante, óleo lubrificante sintético e óleo lubrificante usado) no solo através dos organismos: *Eruca sativa* (rúcula), sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Eisenia andrei* (minhoca) cuja toxicidade apresentou-se reduzida, exceto para o óleo lubrificante usado. Os óleos minerais e sintéticos foram eficientemente biodegradados no solo, embora sua toxicidade não tenha desaparecido completamente após 180 dias do experimento. A avaliação da toxicidade do material biodegradado é de grande relevância ambiental (JUVONEN *et al.* 1999, URURAHY *et al.*, 1998).

Segundo Tamada *et al.* (2013) os testes de toxicidade medem indiretamente a biodegradação dos contaminantes, provando ser eficaz para os óleos mineral e sintéticos de acordo com teste toxicológico usando *E. andrei* (minhoca), concluindo-se que a biodegradação ao óleo sintético por micro-organismos adaptados foi acelerada (60 dias) assim como, devido ao fato de ser formado por moléculas, predominantemente, formadas de apenas um tipo de estrutura química.

Toda substância apresenta um potencial tóxico, dependendo da concentração e quantidade cujos bioensaios de toxicidade fornecem importantes informações sobre as consequências da poluição ambiental em organismos. Salienta-se que um composto

químico é considerado tóxico, levemente tóxico e atóxico quando o percentual de inibição da germinação (% I) assume os seguintes valores: $\geq 40\%$; $10-40\%$ e $\leq 10\%$ (TAMADA, 2009; LOPES *et al.*, 2010). O seu estudo vem sendo empregado para determinar o potencial tóxico de diferentes tipos de contaminação no meio ambiente e, juntamente com os parâmetros físico-químicos, permitem o biomonitoramento de diversos tipos efluentes (YOUNG *et al.*, 2012).

Os tipos de testes toxicológicos em meio aquático são classificados basicamente em agudo e crônico, de acordo com o tempo de exposição dos organismos à substância testada. Assim, testes de toxicidade aguda são ferramentas importantes e confiáveis para estimar as concentrações nas quais um determinado produto tóxico provoca efeitos deletérios em uma dada população de organismos (EPA, 1996). Estes testes detectam os efeitos imediatos, normalmente a mortalidade, de uma amostra testada, sendo os organismos expostos a altas concentrações do contaminante num intervalo curto de 0 a 96 horas.

Segundo Flohr 2005 a toxicidade aguda é a manifestação de um efeito em um organismo aquático, em curto espaço de tempo após a administração de uma única dose de uma substância. Em geral, é o primeiro estudo realizado sobre uma substância quando não se tem nenhuma noção ou somente noções teóricas, muito restritas, sobre a substância a ser estudada.

O ensaio de toxicidade aguda permite calcular uma dose ou uma concentração letal (DL_{50} ou CL_{50}) que é a expressão matemática da dose ou a concentração da substância (agente tóxico) que provoca a morte a 50% dos organismos-teste expostos.

Os testes de toxicidade crônica consistem na exposição dos organismos a diferentes concentrações subletais do contaminante por um longo período; a exposição pode ser feita durante um ciclo de vida completo do organismo ou incluir fases dos períodos mais sensíveis da vida do organismo teste, como a reprodução, por exemplo, (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006).

Segundo Restani (2011), os ensaios de toxicidade crônica apresentam um tempo de exposição que deve ser maior que 10% da duração do ciclo de vida do organismo, uma vez que os lançamentos contínuos de efluentes aquáticos ou o contato prolongado com substâncias tóxicas podem provocar efeitos crônicos em funções biológicas.

Nestes estudos avaliam-se os efeitos causados ao organismo-teste por meio da sua exposição às várias concentrações do efluente ou da substância potencialmente tóxica a ser testada, por período determinado (BRETANO, 2006). Portanto, tais estudos

apresentam extrema importância para se comprovar que determinada substância descartada de maneira incorreta no meio ambiente pode causar efeitos nocivos às populações naturais. Testes de toxicidade aguda e crônica são utilizados para verificar a toxicidade de uma substância específica ou do efeito sinérgico de diversos poluentes identificados ou não na amostra, relacionando-se ao impacto sobre a biota do corpo receptor (GIORDANO, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentada a descrição do desenvolvimento experimental utilizado no estudo da Degradação do biodiesel de óleo de algodão (B100) e a Mistura B20 pelos micro-organismos *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* em sistema descontínuo, em biorreator do tipo tanque agitado e aerado. Também foi realizado um estudo da Degradação do combustível B100 em fotoreator.

3.1 Materiais

3.1.1 Combustíveis, substância tensoativa e reagentes

Nesta pesquisa trabalhou-se com dois tipos biodiesel metílico de algodão: a) B100 cedido pelo Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE (Usina piloto de biodiesel de Caetés, PE.); b) B100 produzido no Laboratório de Processos Catalíticos da UFPE (LPC) a partir do óleo refinado de algodão (Tipo 1) que foi adquirido em estabelecimento comercial da cidade de Recife (PE.), cujo índice de acidez foi quantificado previamente pelo método da titulação em meio básico (SILVA *et al.*, 2015).

O óleo diesel, estéril empregado para preparar as Misturas Bx, foi do tipo S 500, isento de aditivo, tendo sido fornecido pela Petrobras Transportes S.A. (Recife PE.). Suas propriedades físico-químicas conforme Resolução ANP 50 (23/12/2013) foram fornecidas pelo distribuidor e estão apresentadas na Tabela A1 do Apêndice 1.

As misturas diesel-biodiesel estéreis (Misturas Bx), B5, B7, B10, B20, B30, B40 e B50 foram preparadas a partir do óleo diesel fornecido e do B100.

3.2 Metodologia Experimental

3.2.1 Produção do Biodiesel

O biodiesel de algodão foi produzido pelo método da transesterificação alcalina homogênea (rota metílica) partir do óleo de algodão refinado (300 cm³). Usou-se para tal um reator de mistura com volume útil de 1000 cm³, agitado mecanicamente (agitador

de Marca Fisaton, modelo 752A). O catalisador utilizado foi o KOH. As condições operacionais foram: razão molar álcool:óleo (A:O): 6:1 em mol; carga de catalisador: 1% (volume de óleo); velocidade angular: 300 rpm; temperatura de processo: 55° C; tempo de processo: 1 hora. Após uma hora de processo, a mistura reagente foi transferida para um funil de decantação (400 cm³) por 24 horas, sendo em seguida separadas as fases: a) pesada (glicerina, resíduo de catalisador, excesso de álcool que não reagiu, água, sabão formado durante a reação e alguns traços de ésteres e glicerídeos); b) a leve (mistura de ésteres metílicos impregnado de excessos reacionais de álcool e de impurezas). Transferiu-se a fase leve para o reator, o pH foi ajustado com ácido acético 20% (v/v) para pH entre 6 e 7. Agitou-se esta mistura a 300 rpm por uma hora a 80° C. Em seguida, adicionou-se sulfato de sódio anidro na concentração de 20 g.L⁻¹ para a desumidificação do B100. Filtrou-se esta mistura. Ao filtrado (B100) adicionou-se o antioxidante BHT (2000 mgL⁻¹) para aumentar a estabilidade do biodiesel (DUNN, 2005; LIANG *et al.*, 2006; DOMINGOS *et al.*, 2007; FERRARI & SOUZA, 2009).

3.2.2 Preparação das Misturas Bx

As Misturas Bx (B5, B7, B10, B20, B30, B40 e B50), sendo x a fração volumétrica do B100 na mistura preparadas *in situ* em base gravimétrica (CAVALCANTI, 2008). Primeiramente, foi feito o cálculo da massa do combustível a ser pesada que corresponderia ao volume necessário deste líquido na formulação de 1000 cm³ para uma dada Mistura Bx. Este procedimento foi realizado usando-se a relação existente entre a massa e o volume de um dado líquido através de sua massa específica, no caso o B100, na temperatura ambiente. Em seguida essa massa foi pesada (semi-analítica Marca METLER Toledo; erro na medida de $\pm 0,01$ g), sendo todo volume correspondente transferido para um balão volumétrico (1000 cm³) cujo volume foi completado com o diesel. Salienta-se que a massa específica do B100, na temperatura ambiente, variou na faixa de 25 a 26° C, foi obtida a partir da curva de calibração (massa específica em função da temperatura) cuja faixa de validade é 20° C a 40° C (Tabela A1 do Apêndice A). As massas específicas dos combustíveis nessa faixa de temperatura foram obtidas de acordo com o método ASTM D 4052 NBR 14065, usando-se densímetro digital de bancada de Marca Anton Paar (modelo DMA 4500). Os

erros experimentais envolvidos nos valores obtidos para a massa específica dos combustíveis foram de $5,0 \times 10^{-5} \text{ g.cm}^{-3}$.

3.3 Micro-organismos

Nos estudos da biodegradação foram usadas culturas puras da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 - UFPEDA 416), e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 510 - UFPEDEQ), pertencentes à coleção de micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPEDA e do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco.

Nos primeiros ensaios as culturas puras foram cultivadas em meios Agar Mueller-Hinton (*P. aeruginosa*) e Agar de Sabouraud (*S. cerevisiae*), nos ensaios posteriores, usou-se linhagens adaptadas (Item 3.3.2) aos combustíveis-testes (D, B100 e B20).

3.3.1 Meio de Cultura

Para os testes de biodegradação foi utilizado o meio de cultura mínimo (MCM), cuja composição está descrita na Tabela 1. No caso das culturas adaptadas, acresceu-se individualmente ao meio mínimo 5% (v/v) dos combustíveis-testes (D, B100 e B20).

Tabela 1- Composição do Meio de Cultura Mínimo em água destilada (100 cm^3).

Componentes	VALOR
NaCl	0,50g
K ₂ HPO ₄	0,10g
KH ₂ PO ₄	0,10g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02g
KNO ₃	0,30g

Fonte: VIEIRA *et al.*, 2006.

3.3.2 Adaptação das Linhagens Microbianas Puras

Diversos autores têm apontado que a adaptação de culturas microbianas ao poluente é preponderante no processo de biodegradação de hidrocarbonetos e resulta em um aumento do potencial de oxidação e consequente aumento da taxa de degradação (LEAHY & COLWELL, 1990).

O processo de adaptação individual dos micro-organismos a cada combustível usado nesta pesquisa (D, B100 e B20), foi realizado em duas etapas: a) Etapa 1: preparação dos inóculos das culturas de micro-organismos de linhagem puras (duração: 48 horas); b) Etapa 2: adaptação microbiana ao combustível (duração: 144 horas).

Etapa 1: As culturas microbianas foram reativadas em 200 cm³ do meio MCM e mantidas em uma câmara incubadora (Marca MARCONI, modelo MA-420), por 48 horas, sob agitação contínua de 120 rpm e a 30° C.

Etapa 2: 50 cm³ de cada inóculo microbiano produzido no final da Etapa 1 foram acondicionados, individualmente, em Erlenmeyer (500 cm³) contendo 300 cm³ de MCM. Em seguida, foram adicionados à cada suspensão microbiana 1% (v/v) do tensoativo ($1,1 \times 10^{-2}$ g.cm⁻³) LESS70, e 1% (v/v) do combustível (3 cm³). Em seguida, os Erlenmeyers foram acondicionados em uma câmara incubadora, sob agitação contínua (120 rpm) por 48 horas a 30° C. No final deste período foram adicionados mais combustível à suspensão microbiana, 3% (v/v) que corresponderam a (9,09 cm³). Os Erlenmeyers voltaram a ser agitados continuamente (120 rpm) por 48 horas a 30° C. No final do processo, adicionou-se pela última vez, o combustível à suspensão (5% v/v), que corresponde a (15,60 cm³). As linhagens adaptadas foram repicadas para tubos rosqueados, contendo meio Agar MCM acrescido de 5% (v/v) do combustível (D, B20 e B100) e 1% (v/v) de LESS70 ($1,1 \times 10^{-2}$ g.cm⁻³) sendo então, incubadas em estufa de cultura (Marca Fanem Ltda e modelo 002 CB) a 30 °C por 48 horas e mantidas sob camadas de 3 cm³ de óleo mineral estéril.

3.3.3 Curva de Padronização dos Inóculos

Após serem reativadas as linhagens microbianas foram removidas com 5 cm³ de meio MCM e transferidas para Erlenmeyer (125 cm³) contendo 45 cm³ de meio MCM glicosado. Os frascos foram incubados sob agitação contínua de 120 rpm a 30 °C por 13 horas e ao final do processo, cada suspensão microbiana foi transferida,

individualmente, para balões de fundo chato (1.000 cm^3), contendo 450 cm^3 de meio MCM glicosado. Os balões foram então acondicionados em câmara incubadora sob agitação de 120 rpm a $30\text{ }^\circ\text{C}$ por período total de 13 horas. Para a construção da curva de calibração amostras de 5 cm^3 foram retiradas a cada hora e determinadas as concentrações de células viáveis (X) e a densidade ótica a 600nm ($\text{D.O.}_{600\text{nm}}$). A concentração de células viáveis foi obtida a partir da técnica de diluição sucessiva, usando-se o método do tipo *pour plate*, em meio *Plate Count Agar* (PCA). A densidade ótica da suspensão das linhagens microbianas foi obtida via turbidimetria a 600 nm (BASSO *et al.*, 2011). O branco foi o meio MCM glicosado (3 cm^3). A curva obtida foi utilizada para se estimar a concentração celular na fase log de crescimento e o valor da densidade ótica correspondente a uma concentração de 10^7 UFC.cm^{-3} foi utilizado como padrão para o inóculo.

3.4 Estudo da Fitotoxicidade dos Combustíveis

Inicialmente foram preparados 10 ensaios formuladas com água destilada, tensoativo LESS70 ($1,10 \times 10^{-2}\text{ g.cm}^{-3}$) e combustíveis (D, B100, Misturas B5, B7, B10, B20, B30, B40 e B50) nas concentrações 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% e 10% (v/v), sem o controle de pH, sob agitação de 120 rpm por 100 minutos. Salienta-se que o tensoativo LESS70 foi adicionado ao meio para favorecer a dissolução dos combustíveis. Estes ensaios serviram para verificar o efeito tóxico à semente de alface quanto a presença dos combustíveis.

3.4.1 Teste de Toxicidade (Ttox)

Tomou-se como base para a realização dos Ttox a metodologia relatada por Tiquia *et al.*, (1996). O organismo-teste utilizado foi à semente de alface (*Lactuca sativa L.*), recomendada pelos órgãos americanos *United States Enviromental Protection Agency* (USEPA) e *Federal Drug Administration* (FDA).

3.5 Processo Biodegradativo dos combustíveis

3.5.1 Estudos Preliminares

Nos estudos preliminares verificou-se a biodegradação aeróbia dos combustíveis B100, D e B20 dissolvidos em água na concentração de 5% (v/v) contendo macro e micronutrientes, utilizando as linhagens puras *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* não adaptadas e adaptadas.

Os processos biodegradativos foram desenvolvidos em seis balões de fundo chato com volumes úteis de 1500 cm³ cada, conectados a um compressor de ar alimentado com ar estéril na vazão de 28,33 cm³.s⁻¹. Os sistemas foram acondicionados em uma câmara incubadora (Marca MARCONI, modelo MA-420) com agitação orbital e controle de temperatura (Figura 3). A biodegradação foi avaliada pelos micro-organismos (*P. aeruginosa*; *S. cerevisiae*) sem adaptação e com adaptação a cada combustível, o que gerou dois estudos, a ver: a) Estudo 1: Biodegradação dos B100, D e B20 em balões por linhagens dos micro-organismos *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* não adaptadas; b) Estudo 2: Biodegradação destes combustíveis por linhagens dos micro-organismos *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* adaptados a 5% (v/v) do combustível. Os experimentos foram realizados conforme Tabela 2.

Tabela 2- Esquema experimental dos estudos preliminares.

Combustível	Micro-organismos	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. cerevisiae</i>
D-1	Não adaptada	Não adaptada
D-2	Adaptada	Adaptada
B100-1	Não adaptada	Não adaptada
B100-2	Adaptada	Adaptada
B20-1	Não adaptada	Não adaptada
B20-2	Adaptada	Adaptada

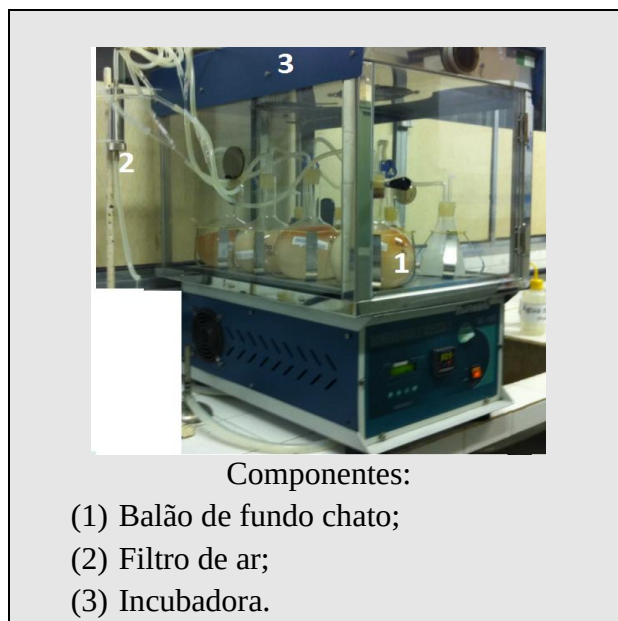


Figura 3- Macrografia: Câmara incubadora contendo os balões.

Estudo 1: O balão de fundo chato (volume útil: 1000 cm^3) que iria operar como reator de mistura, foi alimentado com combustível (5%), meio MCM (69%), substância tensoativa LESS 70 (1%) e inóculo (25%). Os balões foram mantidos sob agitação orbital contínua (120 rpm), temperatura 30°C por 12 dias (Figura 3). Amostras foram coletadas (20 cm^3) em: 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias de processo e mensuradas as concentração de células viáveis, o pH, DQO, DBO_5 e toxicidade. Este procedimento foi realizado para cada combustível e micro-organismo.

Estudo 2: Mesmo procedimento realizado no Estudo 1 foi utilizado no estudo sobre o processo de biodegradação dos combustíveis (B100, D e B20) em balão por linhagens dos micro-organismos *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* adaptadas a 5% (v/v) do combustível.

3.5.2 Cinética da Biodegradação em Biorreator tipo Tanque

A cinética foi conduzida em biorreator tipo Tanque (7000 cm^3) na temperatura de 30°C por 62 dias com o micro-organismo mais eficiente para o processo de biodegradação determinado pelo estudo preliminar. A relação do teor de ésteres de ácidos graxos versus a concentração de células viáveis, pH, DQO, DBO_5 e toxicidade foi estabelecida. A biodegradação do B100 e da Mistura B20 foram realizados em três

ensaios: (a) Ensaio 1: B100 (Biodiesel 2) em meio MCM sem modificação da sua composição cuja constituição foi de: B100 estéril (5%), meio MCM (69%), substância tensoativa LESS 70 (1%) e inóculo (25%); (b) Ensaio 2: B100 (Biodiesel 3) em meio MCM com modificação na relação carbono: nitrogênio C:N de 50:1, onde adicionou-se ao sistema 100 cm³ da solução aquosa de KNO₃ (estéril) de 75 g.L⁻¹, visando-se melhorar a eficiência do processo ou seja, potencializar o micro-organismo no processo de degradação do combustível.(c) Ensaio 3: idêntico ao Ensaio 2 modificando apenas o combustível para B20. A mistura aquosa foi agitada a 250 rpm e aerada continuamente por uma corrente de ar estéril (0,5 v.v.m).

3.5.2.1 Sistema Experimental

O sistema utilizado no estudo do processo de biodegradação dos combustíveis B100 e Mistura B20 dissolvidos em água foi realizada em um biorreator de mistura de Marca SARTORIUS, modelo Biostat[®] B (Figura 4), com capacidade nominal de 10.000 cm³, agitado mecanicamente com temperatura controlada (30° C). Ao biorreator foi acoplado um compressor de ar (Marca Boyu ACQ-001). Na tubulação de alimentação do ar foi inserido um filtro de ar para manter o sistema estéril.



Figura 4- Macrografia: Biorreator de bancada Biostat[®] B.

3.6 Estudo da Degradação por Fotólise direta a 254 nm (Fotoreator anular)

O estudo da degradação oxidativa do B100 a 5% (v/v) dissolvido em água pelo processo de fotólise ocorreu na temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 750 rpm e 2000 rpm por um período de 28.200 segundos. Os sistemas continham 7.840 cm^3 de água destilada, 400 cm^3 do B100 (Biodiesel 6) a 750 rpm e B100 (Biodiesel 5) a 2000 rpm; 80 cm^3 de LESS70 ($1,1 \times 10^{-2}\text{ g.cm}^{-3}$) que correspondem a 94, 5 e 1% do volume total de líquido (8.000 cm^3). A amostragem da fase líquida (50 cm^3) foi procedida nos tempos: 0, 300, 600, 900, 1.200, 1.800, 3.000, 4.800, 7.200, 10.200, 13.800, 18.000, 22.800 e 28.200 segundos sendo mensurados: pH, DQO, DBO_5 , toxicidade e teor de ésteres de ácidos graxos.

3.6.1 Sistema Experimental

O sistema era constituído por um fotoreator tipo anular acoplado em série a um tanque de reciclo e um condensador do tipo bola operado com a fase líquida circulando em circuito fechado (Figura 5) com capacidade nominal de 8.000 cm^3 , agitado mecanicamente. O fotoreator foi projetado com o intuito de eliminar o efeito de bordas com relação à absorção de radiação ultravioleta, isto é, conservando as proporções adequadas entre o comprimento do reator e a altura útil da fonte de radiação ultravioleta (lâmpada germicida de Marca Phillips, modelo TUV 36 W), construído em vidro de quartzo (tubo interno) e vidro Pyrex (tubo externo). O tanque de reciclo é de aço inox 316.

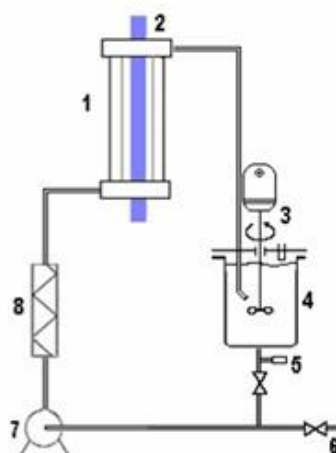


Figura 5- Macrografia: 1. Fotoreator, 2. Lâmpada UV, 3. Agitador, 4. Tanque de reciclo, 5. Ponto de amostragem, 6. Dreno, 7. Bomba, 8. Condensador.

3.7 Determinações Analíticas

a) Caracterização do óleo e dos combustíveis

O índice de acidez revela o estado de conservação do óleo uma vez que, elevada sua acidez dificulta a reação de produção do B100, expresso em ml de solução normal por cento de v/p ou g de ácido oleico por cento p/p, conforme a norma ASTM-D664.

b) Teor de ésteres de ácidos graxos

O teor de éster das amostras foi determinado por cromatografia gasosa, que identifica e quantifica o maior número de constituintes em misturas complexas (Pedroso *et al.*, 2009).

A cromatografia gasosa consiste em um dos métodos mais utilizados para a análise da degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (RESCHKE, 2012). O líquido metabólico (sobrenadante) é coletado de forma estéril, filtrado em membrana microporosa de 0,22µm em um sistema de filtração a vácuo (Millipore) e submetido à extração com hexano, sendo a fase polar destinada às análises cromatográficas para avaliar a degradação de cadeias de ésteres de ácidos sob ação do micro-organismo, usando-se cromatografo de Marca CG, modelo Master com coluna capilar HP-Innowax (30mx0,32mmx0,25micrometro), padrão interno heptadecanoato de metila (C17:00), detector DIC e gás de arraste, hidrogênio com 99 % de pureza (White Martins) com vazão de $8,3 \times 10^{-8} \text{ m}^3/\text{s}$, temperaturas: forno (180 °C), injetor (200 °C) e vaporizador (230 °C).

c) Concentração de biomassa microbiana

A amostragem (1 cm³) foi submetida a diluições sucessivas e inoculadas em duplicata em placas de Petri (*pour plate*), em meio *Plate Count Agar* (PCA), Marca Merck, expressa em UFC.cm⁻³. As placas foram mantidas em estufa de cultura (Marca Fanem Ltda, modelo 002 CB) a 30°C por 48 horas para fins de quantificação da concentração celular.

d) pH

Foi realizada a determinação de potencial hidrogênionico (pH) do líquido metabólico (20 cm³) para detectar a produção de metabólitos ácidos, coletada de forma estéril e filtrada em membrana microporosa de 0,22µm em um sistema de filtração a

vácuo (Millipore), através do medidor de pH de bancada, Marca MARCONI, modelo PA 200/PA 200P.

e) DQO

Determinado a partir do líquido metabólico coletado de forma estéril e filtrada em membrana microporosa de 0,22µm em um sistema de filtração a vácuo (Millipore), usando-se o bloco digestor de DQO (Marca MERCK e modelo Spectroquant TR 420), método SMEWW 5220D: refluxo fechado/colorimetria ($K_2Cr_2O_7$), Marca Merck, modelo Spectroquant TR 420 e Espectrofotômetro UV-Visível (Marca Thermo Scientific, modelo: Genesys 10s UV-VIS Spectrophotometer), respectivamente.

f) DBO₅

Determinado a partir do líquido metabólico coletado de forma estéril e filtrada em membrana microporosa de 0,22µm em um sistema de filtração a vácuo (Millipore), em Incubadora DBO, Marca Quimis, modelo Q-315 M26 (*Standard Methods* 5210B).

g) Fitotoxicidade

A toxidade aguda dos combustíveis e das misturas reagentes às sementes de alface foram avaliadas de acordo metodologia relatada por Tiquia *et al.*, (1996). Dez sementes de alface foram distribuídas, equidistantemente, no papel de filtro acondicionado em placas de Petri (diâmetro: 9,0 cm). O líquido metabólico (2,0 cm³) coletado de forma estéril e filtrado em membrana microporosa de 0,22µm em um sistema de filtração a vácuo (Millipore), sendo distribuído sobre o papel de filtro.

A placa de Petri foi fechada e embalada com filme de PVC transparente para evitar perda de umidade, sendo em seguida, acondicionadas em estufa (Marca Fanem Ltda, modelo 002 CB) a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em ausência de luz por período de 5 dias. Após o período de incubação, as sementes foram removidas para se quantificar os seguintes parâmetros de toxidade: a) percentual de germinação (% G), b) percentual de crescimento da raiz (% C), c) percentual inibição das sementes de alface (% I) e índice de germinação das sementes de alface (IG), foram calculados de acordo com Equações 8 a 11, respectivamente.

$$\%G = \frac{N_A}{N_c} \times 100 \quad (8)$$

$$\%C = \frac{C_A}{C_c} \times 100 \quad (9)$$

$$IG = \frac{\%G \times \%C}{100} \quad (10)$$

$$\%I = 100 - \%G \quad (11)$$

Sendo N e C as médias aritméticas do número de sementes germinadas e o comprimento da raiz (radícula e do hipocótilo), respectivamente; os sub índices A e C representam a amostra e o teste-controle-negativo, respectivamente.

O *Trimmed Spearman-Kärber Method*, Versão 1.5, foi utilizado para se obter os valores da Concentração Letal Mediana (CL_{50}). Após a germinação, tem-se como critério a protrusão radicular mínimo de 2,0 mm de comprimento (JUSTO *et al.*, 2007). Os ensaios foram realizados em triplicata. Foram realizados testes de integridade e sensibilidade das sementes de alface (Testes-controle) sem ajuste de pH: a) Teste-controle-negativo, CN (água destilada); b) Teste-controle-positivo (CP): teste de sensibilidade com substância de referência, solução de aquosa de $ZnSO_4$ a 0,05M (Cruz *et al.*, 2013) para avaliar a sanidade dos organismos-testes. O controle de sensibilidade dos organismos, através da realização periódica de ensaios com determinadas substâncias de referência, trata-se de um procedimento que dá maior precisão e confiabilidade aos resultados. Investigou-se os seguintes efeitos sobre o processo de germinação das sementes de alface: a) água destilada: ajustou-se em pH 7, 6, 5, 4 e 3, usando-se NaOH e H_2SO_4 a 98%; b) tensoativo: 1% de LESS70 dissolvido a concentração de $1,1 \times 10^{-2} g \cdot cm^{-3}$, ajustou-se em pH 7, 6, 5, 4 e 3, usando-se NaOH e H_2SO_4 a 98%; c) concentração do poluente dissolvido nas águas modelos (sem ajuste do pH). A concentração do poluente variou na faixa de 1% a 10% (v/v); d) pH: ajustou-se o pH da água modelo com concentração de 5% (v/v) em pH 7, 6, 5, 4 e 3, usando-se NaOH e H_2SO_4 a 98%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise da matéria prima

4.1.1 Óleo de algodão

Determinou-se a quantificação do índice de acidez (I_{AC}) do óleo de algodão, que apresentou valor igual a $0,28 \text{ mg KOH.g}^{-1}$ o qual é recomendado na literatura, Silva *et al.*(2015), que as biomassas lipídicas devem apresentar valor para o I_{AC} de até 3 mg KOH.g^{-1} para que se possa proceder a produção de B100 por meio do processo de transesterificação homogênea alcalina em único estágio, valores maiores requerem processo com pré-tratamento.

4.1.2 Biodiesel

A Tabela 3 fornece a composição de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos, EMAG dos B100 de algodão (B100-1 a B100-6), produzidos a partir de óleos de algodão em várias bateladas.

Os resultados analíticos revelaram que os B100 de algodão produzidos foram compostos pelos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos Saturados (EMAG-Sat.): láurico, C12:0, mirístico, C14:0, palmítico, C16:0, esteárico, C18:0, e araquídico, C20:0), e insaturados (EMAG-Ins.): palmitoléico, C16:1, oléico, C18:1, linoléico, C18:2 e linolênico, C18:3. Os valores obtidos para o percentual mássico de EMAG-Sat. e EMAG-Ins. dos B100-1 a B100-6, estão apresentados na Tabela 4.

Os EMAG de maiores contribuições nas composições dos B100 foram o linoléico, palmítico e oléico. Estes resultados estão compatíveis com os valores obtidos por Cavalcanti, 2008 e Rocha, 2011.

Tabela 3- Composição dos B100 de algodão produzidos em termos dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos.

Biodiesel	Teor mássico dos EMAG (%)								
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
B100-1*	0,00	0,00	26,40	0,60	4,80	15,90	52,30	0,00	0,00
B100-2**	0,00	0,80	24,95	0,00	0,46	11,54	58,94	2,29	0,69
B100-3**	0,00	0,89	25,91	0,00	0,52	11,00	58,20	2,56	0,78
B100-4**	6,32	15,52	20,41	0,00	0,00	12,98	44,76	0,00	0,00
B100-5**	0,00	2,60	28,17	0,00	2,71	14,47	52,05	0,00	0,00
B100-6**	0,00	0,70	24,95	0,00	0,40	11,40	59,94	2,00	0,59

* B100 cedido gentilmente pelo CETENE.

** B100 produzido no Laboratório de Processos Catalíticos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco a partir de óleo refinado do Tipo 1 adquirido em supermercado (Item 3.1.1).

Tabela 4- Teor de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos saturados e insaturados para os B100.

Teor mássico (%)	Biodiesel					
	B100-1	B100-2	B100-3	B100-4	B100-5	B100-6
EMAG-Sat.	31,20	26,90	26,72	42,25	33,48	26,64
EMAG-Ins.	68,80	72,77	73,27	57,74	66,52	73,34
Total	100,00	99,67	99,99	99,97	100,00	99,98

Segundo Allinger *et al.*(1985) e Morrison & Boyd (1992) é pertinente postular-se que a biodegradabilidade do B100 depende de fatores relacionados com os tipos de EMAG presentes nesse combustível, uma vez que, moléculas com baixa estabilidade favorecerão a oxidação Singer e Finnerty (1984) do teor desses ésteres na composição do B100.

De forma qualitativa, pode-se ter uma primeira ideia da biodegradação do B100 de algodão através da avaliação dos EMAG que o compõe (Tabela 4) que embora parecidas, o B100-6, expressa 73,34 % de EMAG-Ins. portanto, pode ser mais suscetível a biodegradação. Encontra-se na literatura que a estabilidade dos ésteres de ácidos graxos depende do número de carbonos e ramificações da cadeia, valendo então a seguinte relação entre a instabilidade estrutural dos EMAG: a) EMAG-Ins. > EMAG-Sat.; b) EMAG-Ins. (3 Ins.) > EMAG-Ins. (2 Ins.) > EMAG-Ins. (1 Ins.), onde “n Ins.”

representa o número de insaturações presentes na molécula do éster (ALLINGER *et al.*, 1985; MORRISON & BOYD, 1992).

4.2 Curva de Crescimento para Padronização de Inóculo

As curvas de crescimento celular das linhagens de *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* utilizadas para a padronização do inóculo estão mostradas nas (Figura 6 a) e (Figura 7 a), respectivamente. Estas foram utilizadas para estimar a densidade ótica na concentração inicial de células viáveis no valor de 10^7 UFC.cm⁻³, na fase exponencial. Para a *P. aeruginosa* o valor da densidade ótica foi de 0,31 correspondente a concentração 2×10^7 UFC.cm⁻³ ou um valor de $\text{Ln}(X) = 16,81$ (Figura 6b) e para a *S. cerevisiae* o valor de densidade ótica foi de 0,26 correspondente a concentração 1×10^7 UFC.cm⁻³ ou um valor de $\text{Ln}(X) = 16,12$ (Figura 7b).

De acordo com Assis *et al.* (2007) os micro-organismos na fase exponencial apresentam uma maior atividade metabólica da célula e, portanto, o estágio ideal para utilização das células nos ensaios, uma vez que, estas células apresentam-se metabolicamente ativas e energizadas (THOMAS *et al.*, 2000).

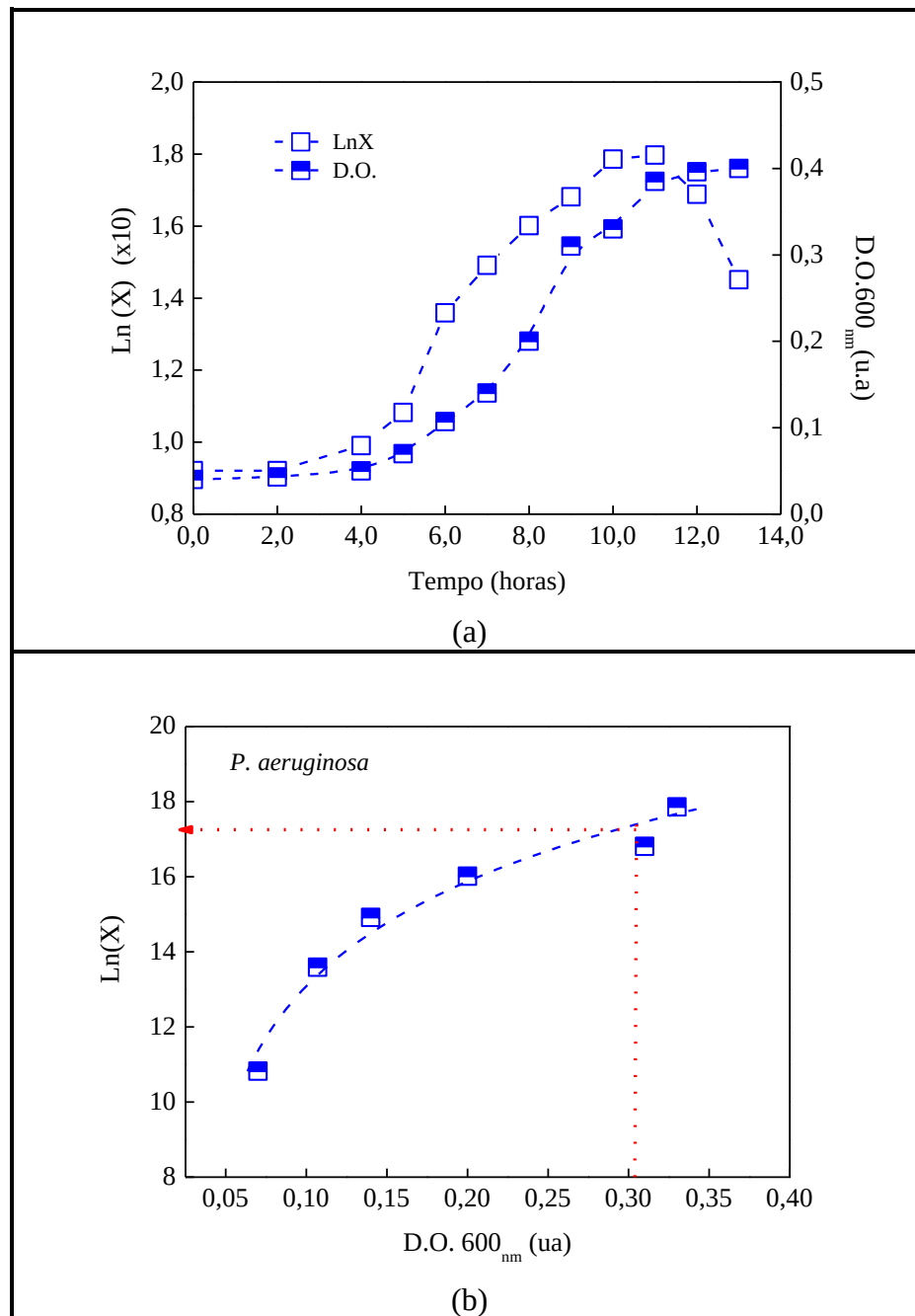


Figura 6- Curva de crescimento celular para a *P. aeruginosa* (a) e curva da fase exponencial (b), Meio de Cultura Mínimo com glicose, 30°C, 120 rpm.

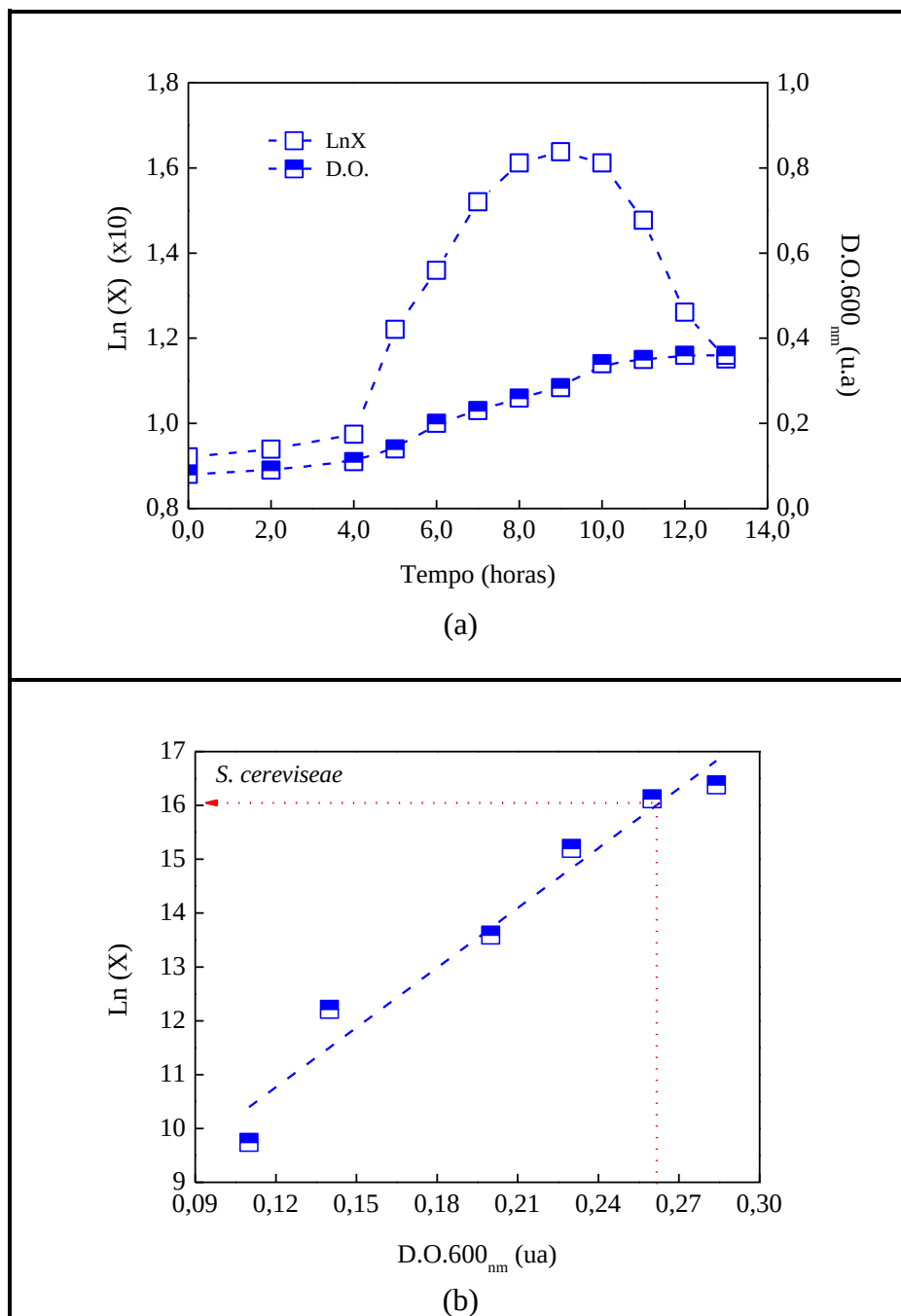


Figura 7- Curva de crescimento celular para a *S. cerevisiae* (a) e curva da fase exponencial (b), Meio de Cultura Mínimo com glicose, 30°C, 120 rpm.

4.3 Estudo da Fitotoxicidade

4.3.1 Análise da Fitotoxicidade das Águas Modelos

Quando o ambiente aquático recebe em seu corpo, poluentes orgânicos, geralmente, passa a apresentar toxicidade a sua biota, podendo essa toxicidade ter

caráter fraco, médio ou forte (TAMADA, 2009; LOPES *et al.*, 2010). Avaliar-se a fitotoxicidade das águas modelos contendo esses combustíveis, inclusive a do diesel, dispersos, contribuirá para a tomada de decisão quanto à necessidade de submeter o ambiente aquático a um dado processo de degradação, em vez, de esperar que os mesmos degradem sob as ações naturais da luz solar e de micro-organismos presentes no ambiente aquático que sejam agentes degradadores de biodiesel e do diesel.

As águas modelos foram preparadas dispersando-se os combustíveis (B100, Mistura B20 e Diesel) com concentração de 5% (v/v) em água destilada (faixa de pH: 3 a 7). Para se aumentar a solubilidade desses combustíveis na água destilada, agregou-se 1% (v/v ou $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$) do tensoativo Lauril 70 (LESS70). Portanto, houve a necessidade de avaliar se o LESS70 e o pH da água destilada podem conferir algum efeito tóxico sobre a germinação do organismo-teste, no caso, semente de alface (*L. sativa*). Assim procedendo, pode-se isolar o efeito tóxico sobre as sementes de alface causado pela água destilada contendo esses combustíveis. Os testes de controle positivo e negativo (avaliam a sensibilidade do organismo-teste) também foram realizados.

Testes de fitotoxicidade das águas modelos formuladas com água destilada foram realizados. Foram investigados os seguintes efeitos: (a) Efeito da acidez da água modelo sobre a fitotoxicidade às sementes para a água destilada, faixa de pH: 3 a 7; (b) Efeito da acidez do meio sobre a fitotoxicidade às sementes para as águas modelos formuladas com $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ LESS70, faixa de pH: 3 a 7; (c) Efeito da acidez da água modelo sobre a fitotoxicidade às sementes para as águas modelos formuladas com $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ LESS70 e 5% (v/v) de combustível (Diesel, biodiesel e Mistura B20), faixa de pH: 3 a 7; (d) Efeito da concentração dos combustíveis sobre a fitotoxicidade às sementes (faixa de concentração: 1-10% v/v), em pH natural; (e) Obtenção da concentração de 50% de letalidade às sementes para as águas modelos formuladas com $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ LESS70 e os combustíveis (faixa de concentração: 1-10% v/v), em pH natural.

4.3.1.1 Testes Preliminares

4.3.1.1.1 Sensibilidade das Sementes

As sementes de alface (*L. sativa*) apresentaram alta sensibilidade durante os testes de toxicidade (T_{tox}) seguem algumas observações pertinentes: (a) Durante o teste de controle positivo (solução aquosa de ZnSO_4 a 0,05M) não se observou germinação

das sementes de alface (Figura 8a); (b) Durante o teste de controle negativo (água destilada em seu pH natural), observou-se que 100% das sementes germinaram (Figura 8b). Tais resultados confirmam a viabilidade de uso das sementes nos testes de fitotoxicidade assim como a autenticidade do método, uma vez que, um percentual de germinação das sementes mínimo de 65% é esperado para o teste de controle negativo (CRUZ *et al.*, 2013).

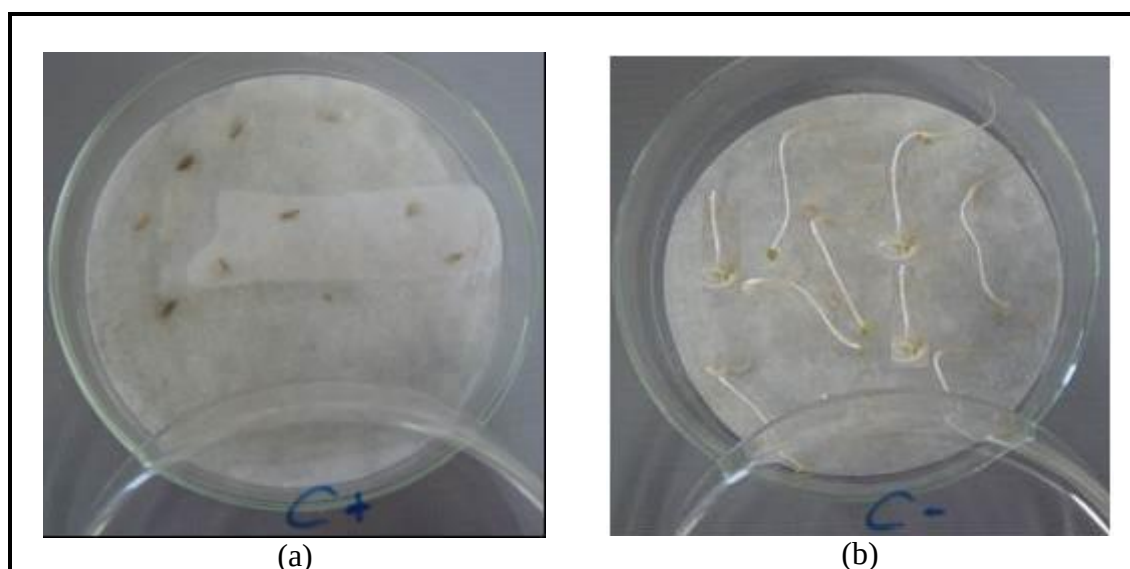


Figura 8- Macrografia de sementes de alface após serem submetidas aos Ttox: (a) Teste de controle positivo (CP); (b) Teste de controle negativo (CN).

Segundo Romero & Cantú (2008) deve-se verificar se as sementes a serem utilizadas no Ttox apresentam taxa de germinação acima de 90% e sincronização na germinação, para o controle negativo com 100% de percentual de germinação confirmando então a sincronização.

4.3.1.2 Estudo da Fitotoxicidade em Água Destilada a Diferentes Valores de pH

O efeito da acidez à água destilada (faixa de pH: 3 a 7) sobre a germinação das sementes de alface foi investigado. Os valores médios associados ao desvio padrão (σ) obtidos para os parâmetros do método de fitotoxicidade, P_{Ttox} [percentual de germinação (% G), percentual de crescimento da raiz (% C), percentual inibição (% I) e índice de germinação (IG)], estão apresentados na Tabela 5. O efeito da acidez da água destilada sobre tais parâmetros pode ser evidenciado na Figura 9.

Os valores para os parâmetros de fitotoxicidade estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5–Efeito da acidez na água destilada sobre os parâmetros de fitotoxicidade.

pH	Água destilada			
	G $\pm$ δ (%)	C $\pm$ δ (%)	IG $\pm$ δ	I $\pm$ δ (%)
3	30,0 $\pm$ 0,0	13,0 $\pm$ 0,0	3,9 $\pm$ 0,0	70,0 $\pm$ 0,0
4	45,0 $\pm$ 0,0	21,8 $\pm$ 0,5	9,8 $\pm$ 2,0	55,0 $\pm$ 0,5
5	55,0 $\pm$ 0,0	48,8 $\pm$ 1,0	26,8 $\pm$ 0,1	45,0 $\pm$ 0,0
6	80,0 $\pm$ 1,0	52,0 $\pm$ 0,6	41,6 $\pm$ 0,1	20,0 $\pm$ 0,1
7	70,0 $\pm$ 1,0	57,0 $\pm$ 1,3	39,9 $\pm$ 1,0	30,0 $\pm$ 1,0

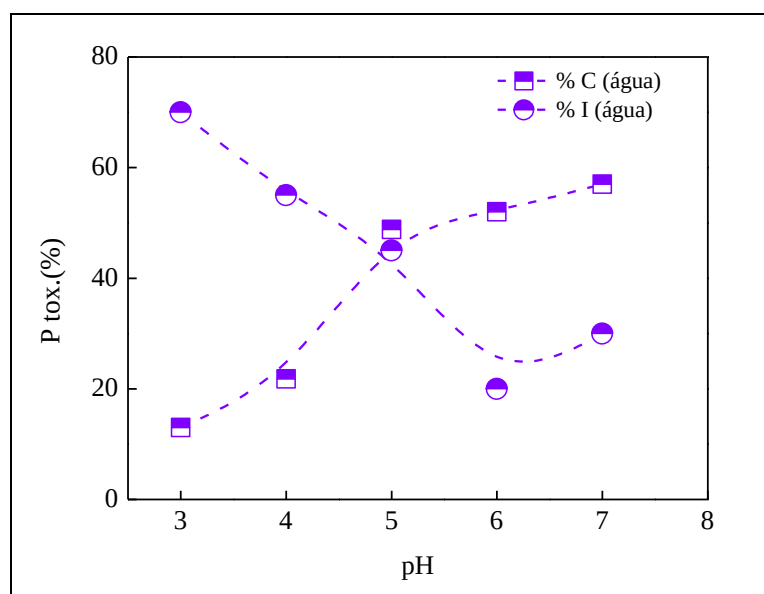


Figura 9- Efeito da acidez da água destilada sobre os parâmetros do método de germinação.

Os resultados indicam que a acidez da água destilada afeta o processo de germinação das sementes de alface, pois os valores obtidos para o percentual de inibição (%I) desceram à medida que a acidez do meio aumenta, ou seja, para os pH 7 e 3 os valores obtidos para %I foram (70,0 $\pm$ 0,0)% e (30,0 $\pm$ 1,0)%, respectivamente.

Segundo Tamada (2009) e Lopes *et al.* (2010) para que um composto ou meio seja considerado fitotóxico deve haver inibição da germinação no mínimo de 40% sobre o número de sementes disponíveis no teste.

Portanto, os resultados obtidos sugerem que a acidez da água destilada, conferem-lhe características de um meio tóxico, sendo a intensidade da fitotoxicidade diminui à medida que o pH aproxima-se da neutralidade. Esses resultados estão de acordo com os reportados na literatura (FERREIRA & AQUILA, 2000; EBERLEIN, 1987).

Por outro lado, os valores do parâmetro %C obtidos para as águas destiladas frente ao controle negativo, apresentaram resultados de $(13,0 \pm 0,0)$ e $(57,0 \pm 1,3)\%$ para o pH 3 e 7 respectivamente, indicando sensibilidade desse parâmetro com o aumento do pH do meio.

O controle do pH é extremamente importante para o desenvolvimento de ensaios toxicológicos pois muitos organismos não podem proliferar em pH abaixo de 4,0 ou acima de 9,5 sendo que, geralmente, o pH ótimo para o desenvolvimento de organismos está entre 6,5 e 7,5 (WERKER & HALL, 1999).

Há relatos na literatura (EBERLEIN, 1987; FERREIRA & AQUILA, 2000) sobre o efeito deletério do pH sobre a germinação e o desenvolvimento das plântulas em meios muito ácidos ($\text{pH} < 4$) ou de alcalinidade elevadas ($\text{pH} > 10$).

As sementes de alface apresentam uma extensa faixa de pH favoráveis à sua germinação, com valores variando na faixa de 3–7 (MARASCHIN-SILVA & ÁQUILA, 2006). Segundo a Environmental Canada (1992), a faixa ideal de pH para a germinação de sementes *L. sativa* é de 6–8. Isso exige um rigoroso controle de pH, já que o equilíbrio dos ecossistemas é muitas vezes frágil e qualquer alteração no meio químico pode ser drástico ao desenvolvimento ambiental.

O alongamento da raiz das sementes de alface é insensível às diferenças de pH assim como, a potenciais osmóticos das soluções no entanto, em pH: 3, 4 e 5 as sementes de alface apresentaram sensibilidade a acidez do meio com valores de $\%I \geq 40\%$ sendo então, considerados tóxicos (TAMADA, 2009; LOPES *et al.*, 2010).

Neste trabalho observou-se que os valores do parâmetro IG, variaram na faixa de $(39,9 \pm 1,0)$ a $(3,9 \pm 0,0)$ à medida que a acidez da água destilada aumenta. Tais resultados indicam que a acidez da água destilada apresenta ação fitotóxica moderada (efeito subletal) sobre as sementes germinadas.

4.3.1.3 Estudo da Fitotoxicidade da Água Destilada contendo LESS70 a Diferentes valores de pH

Uma vez que foi usado o tensoativo LESS70 na formulação das águas modelos como facilitador da dissolução dos combustíveis, foi necessária a investigação da possibilidade desse composto químico conferir, ou não, ações fitotóxicas sobre o organismo-teste (semente de alface).

Os parâmetros %I e %C indicam que o tensoativo LESS70, na concentração utilizada impactou positivamente o processo de germinação das sementes, em termos de toxidades aguda, uma vez que o percentual de crescimento da raiz (%C) foi 63,33% maior e o percentual de inibição (%I) foi 16,66% menor que o observado para a água destilada pura a pH7 (Figura 10 e 11).

Também pode ser verificado que estes parâmetros são dependentes do pH, consequentemente, dependem da acidez do meio (Tabela 6).

Tabela 6– Efeito da acidez na água destilada contendo LESS70 disperso sobre os parâmetros de fitotoxicidade (Concentração de LESS70: $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$).

pH	Água destilada + LESS70 ($1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$)			
	G $\pm \delta$ (%)	C $\pm \delta$ (%)	IG $\pm \delta$	I $\pm \delta$ (%)
3	60,0 $\pm$ 0,0	69,0 $\pm$ 1,0	41,4 $\pm$ 0,0	40,0 $\pm$ 0,0
4	66,6 $\pm$ 0,0	79,5 $\pm$ 0,0	53,0 $\pm$ 0,0	33,3 $\pm$ 0,0
5	70,0 $\pm$ 1,0	79,5 $\pm$ 0,0	55,6 $\pm$ 0,5	30,0 $\pm$ 1,0
6	80,0 $\pm$ 0,0	82,0 $\pm$ 0,0	65,6 $\pm$ 0,0	20,0 $\pm$ 0,0
7	95,0 $\pm$ 0,0	90,0 $\pm$ 2,0	85,5 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 0,0

Os valores obtidos para o %I aumentam com o decrescimento do pH, i.e.: aumentam com o aumento da acidez do meio, atingindo para o pH3, o valor de (40,0 $\pm$ 0,0) %, que corresponde ao percentual de germinação de (60,0 $\pm$ 0,0)%.

Por outro lado, os valores obtidos para o percentual de crescimento das raízes decrescem à medida que o pH do meio afasta-se da neutralidade, atingindo para o pH3, o valor de (69,0 $\pm$ 1,0) %.

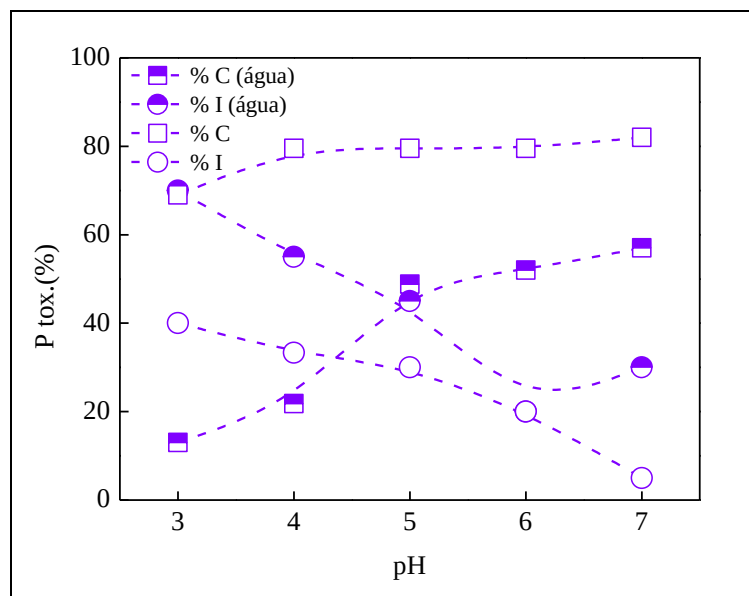


Figura 10- Efeito da acidez na água destilada contendo LESS70 disperso sobre os parâmetros de fitotoxicidade (Concentração de LESS70: $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$).

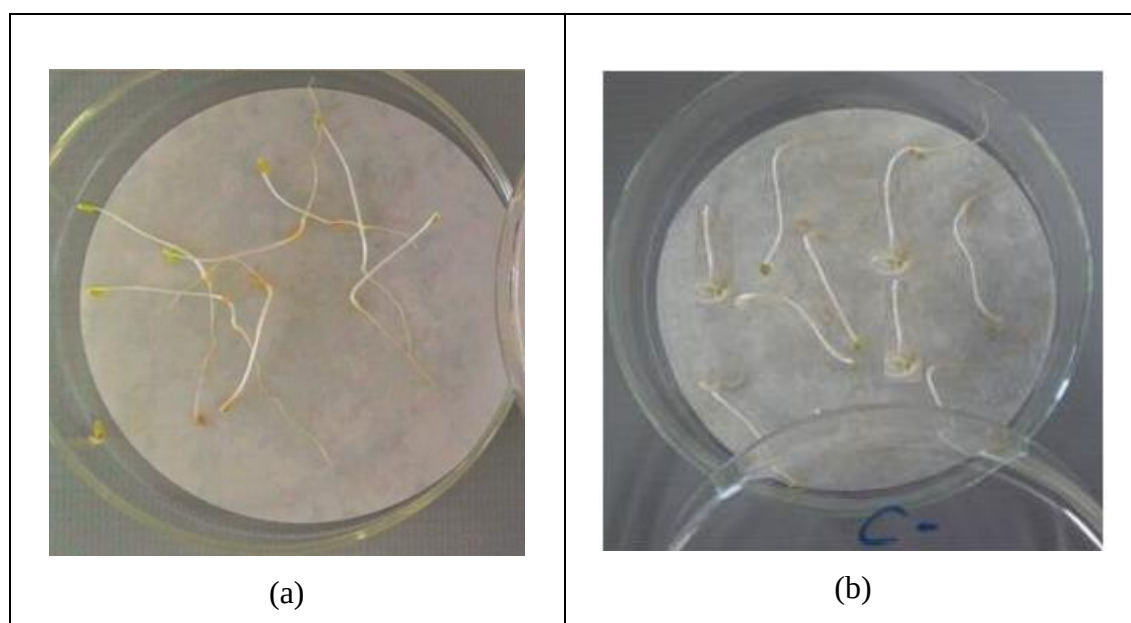


Figura 11- Macrografia das sementes de alface após serem submetidas aos Ttox. (a) Água destilada com LESS70 a pH7; (b) Água destilada pura a pH neutro (controle negativo).

Com relação à classificação encontrada na literatura (Tamada, 2009 e Lopes *et al.*, 2010) quanto a intensidade do caráter tóxico de um meio ou composto químico. Pode-se dizer que a água contendo $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70 comporta-se como um meio: (a) Atóxico para o pH7; (b) Levemente tóxico para o pH na faixa de 4 a 6, que confere efeito subletal às sementes de alface; (c) Tóxico para o pH3. Esta classificação tem como base o fato de que a avaliação do efeito da presença de um dado composto dissolvido em água sobre o alongamento da raiz e do hipocótilo das plântulas das

sementes de alface indica a possível fitotoxicidade dos compostos químicos solúveis presentes no meio em concentrações tão baixas que não são suficientes para inibir a germinação da semente, mas que podem retardar ou inibir o processo de desenvolvimento destas (MONTAGNOLLI *et al.*, 2011).

Salienta-se que, o valor do parâmetro de toxicidade IG (índice de germinação) decresceu de $(85,5 \pm 0,1) \%$ para $(41,4 \pm 0,0)\%$ à medida que a acidez do meio aumento ou seja, quando o pH decresceu de 7 a 3, respectivamente.

Os valores de IG para as faixas de pH 3 a 7 para a água destilada indicam a presença de substâncias fitotóxicas. Para a água destilada contendo LESS70 os valores de IG para o pH na faixa de 7 a 4 indicam presença de substâncias com fitotoxicidade moderada e para o pH 3 presença de substância fitotóxica.

A literatura indica que quando $IG \geq 80$ há ausência ou a presença de substância fitotóxicas no meio em baixas concentrações; $IG \leq 50$ há a presença de substâncias fitotóxicas e quando $50 \leq IG \leq 80$ substâncias com fitotoxicidade moderada estão presentes no meio (Tiquia, 1996).

Portanto, para o caso de água destilada contendo LESS70 na concentração de $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$, tem-se que o meio global apresentou os seguintes comportamentos: (a) pH 7: atóxico às sementes de alface, (b) pH 3: meio fitotóxico às sementes de alface. Os valores intermediários de pH (faixa: 6 a 4) apresentaram meio levemente tóxico e para o controle negativo o meio foi considerado atóxico às sementes de alface.

4.3.1.4 Efeito da Concentração do Combustível nas Águas Modelos

Águas modelos contendo LESS70 ($1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$) e os combustíveis, Diesel (D), e suas misturas B5, B7, B10, B20, B30, B40 e B50 e B100, formuladas com concentração volumétrica dos combustíveis variando na faixa de 1-10% e sem controle de pH. Para efeito de comparação, também se avaliou o %I para os controles (C), água destilada, e água destilada com o tensoativo LESS70 com pH controlado na faixa de pH de 6-7.

Visou-se obter informações como o processo de germinação das sementes é afetado, isoladamente e de forma aguda, pelo aumento da concentração volumétrica dos combustíveis, ou seja, avaliou-se a fitotoxicidade aguda das águas modelos, sem a influência da presença do tensoativo, em função da concentração volumétrica dos combustíveis.

Os resultados experimentais mostram que o pH das águas modelos com os combustíveis ficaram na faixa 6-7 (Tabela B2 do Apêndice B). Também foi observado que o processo de germinação das sementes de alface é afetado, isoladamente e de forma aguda, pelo aumento da concentração volumétrica dos combustíveis, ou seja, mesmo nas águas modelos, com a presença do tensoativo, esse efeito foi verificado (Figura 12).

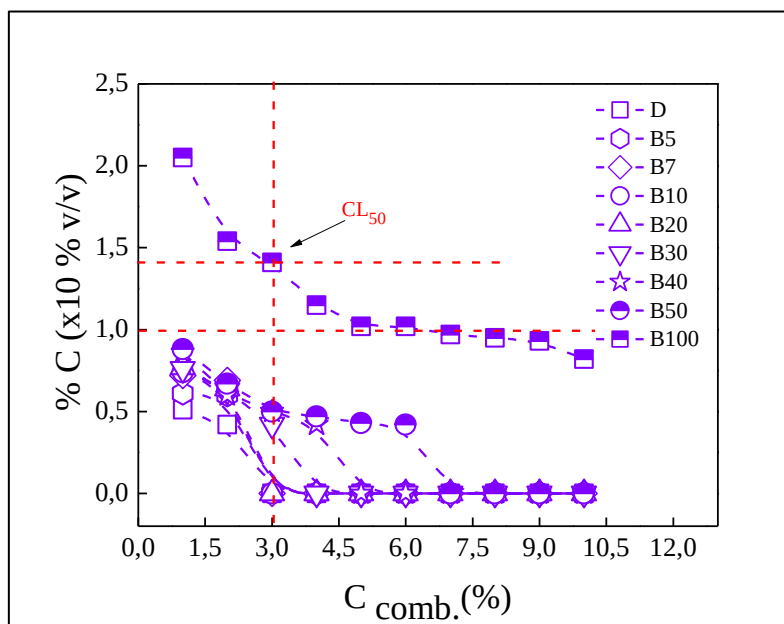


Figura 12- Curvas de sub-letalidade para águas modelos formuladas com Combustíveis e $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70 ($6 < \text{pH} < 7$).

Com relação à classificação encontrada na literatura (Tamada, 2009; Lopes *et al.*, 2010) quanto a intensidade do caráter tóxico de um meio ou composto químico pode-se afirmar que o B100 (faixa de 1% a 10%) comporta-se como: (a) Levemente tóxico para o meio contendo 1% de concentração do B100, que confere efeito subletal às sementes de alface; (b) Tóxico para o meio contendo faixa (2% a 10%) de concentração de B100, com aumento da toxicidade em função do aumento da concentração volumétrica de B100 (TAMADA, 2009; LOPES *et al.*, 2010).

Parida & Das (2005) afirmam que os hidrocarbonetos de baixa massa molar como os presentes em gasolina e diesel apresentam intenso efeito tóxico agudo, principalmente, devido à sua elevada solubilidade e presença de moléculas mais voláteis com capacidade de penetrar nas células e alterar as estruturas celulares.

A baixa toxicidade quando não inibi a germinação da semente, pode afetar o prolongamento da raiz ou do hipocótilo (SOBRERO & RONCO, 2004). Por isso é

importante nos estudos de toxicidade verificar como se comporta o poluente, em termos de toxicidade aguda e crônica, sobre o organismo-teste em função da concentração, ou seja, faixa de concentração que leva a letalidade provocando (efeito agudo) e aquela em que as concentrações permitem a sobrevivência do organismo teste (efeito sub-letal) que promovem a fitotoxicidade ao organismo teste.

Geralmente, emprega-se a concentração que leva a 50% do organismo-teste a letalidade (CL_{50}) para se estimar, o alto grau de confiabilidade das faixas de concentrações que causam toxicidades agudas ou crônicas a esse organismo. Curva de dose-resposta, percentual de inibição versus concentração do poluente, é utilizada para tal avaliação. Curva formada pelos percentuais de crescimento das raízes versus concentração do poluente (curva de efeito agudo) avalia a concentração em que 50% dos organismos-teste são inibidos, (BURATINI & BRANDELLI, 2006).

Neste trabalho os testes de fitotoxicidade consistiram em expor o organismo-teste (sementes de alface) às águas modelos com concentração variando na faixa de 1% a 10% (v/v) de combustível, sem que a amostra sofresse diluição. As curvas dose-resposta geradas para os combustíveis (Diesel, B100, Misturas B5 a B50) estão apresentadas na Figura 13.

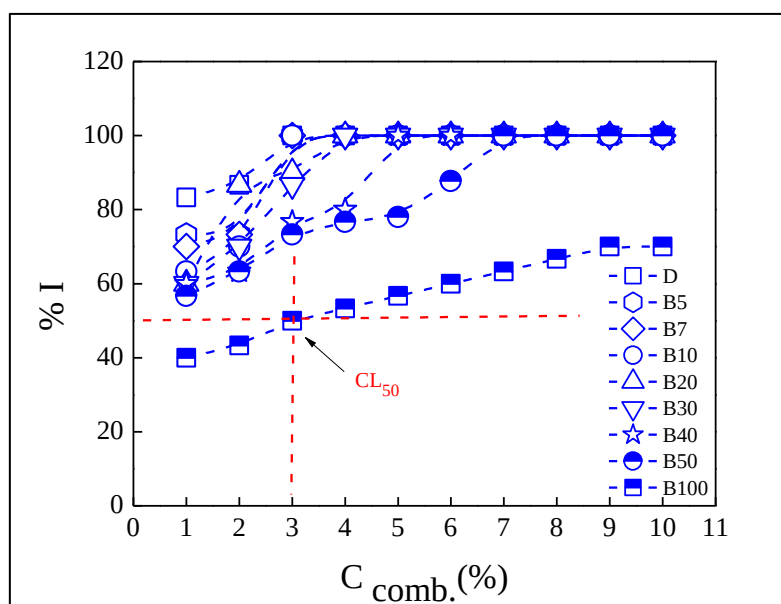


Figura 13-Curvas dose-resposta para as águas modelos formuladas com os Combustíveis e $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70 ($6 < \text{pH} < 7$).

As curvas dose-resposta obtidas para os combustíveis (D e Misturas B5 a B50), Figura 13, sugerem para a faixa de concentração utilizada, as águas modelos

apresentaram valores para o %I maiores que 50% não sendo possível se calcular a sua concentração letal (CL_{50}). Ao aumentar-se a fração volumétrica do biodiesel na faixa de 30-50% observou-se um efeito positivo mais acentuado sobre o parâmetro %I ou seja, Misturas B30, B40 e B50 apresentaram fitotoxicidade aguda menos intensas, o que leva, a um efeito sub-letal ou toxicidade aguda as sementes. No entanto, percebe-se que há uma inibição total na germinação das sementes de alface se as concentrações volumétricas dessas misturas combustíveis (B30, B40 e B50) se forem superiores a 3%.

Com relação ao biodiesel, a curva dose-resposta obtida (Figura 13) indica que a concentração volumétrica de B100 que inibe a germinação de 50% (CL_{50}) das sementes de alface corresponde a um valor igual a 3%. Segundo BIRCHALL; NEWMAN; GREAVES,1995; REDDY,2009 em estudo com Tilápia (*Oreochromis niloticus*) e Dáfnia (*Daphnia magna*) como organismos-teste mostraram que a mortalidade e a CL_{50} foram menores, quando expostos ao biodiesel e suas misturas comparadas ao diesel de petróleo.

4.3.1.5 Efeito do pH para Águas Modelos com LESS 70 e biocombustível

Investigou-se a influência das águas modelos, formuladas com $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70 e 5% (v/v) de combustíveis (Diesel, B100 e da Mistura B20) e pH variando na faixa de 3 a 7, sobre o processo de germinação das sementes alface (Figuras 14-15).

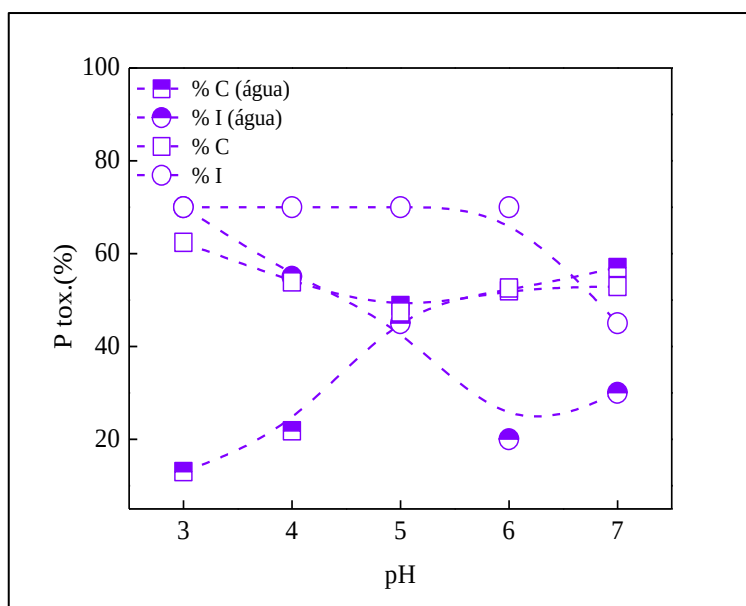


Figura 14- Parâmetros de toxicidade %I e %C em função do pH para águas-modelos contendo B100 (5% v/v) e LESS70 ($1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$).

De acordo com a Figura 14, a água formulada com 5% (v/v) de B100 e $1,1 \times 10^{-2}$ g.cm⁻³ de LESS70, afetou o parâmetro de fitotoxicidade %I, o que indica o processo de germinação daquelas sementes dependeu também da acidez do meio.

Como pode se observar na Figura 14, a água modelo contendo 5% (v/v) de B100 é tóxica as sementes de alface para o pH variando na faixa de 3-6, com %I = (70,0±3,0) % sendo verificada redução deste percentual para o pH7 (45,0±2,2) no entanto, ainda é considerada tóxica.

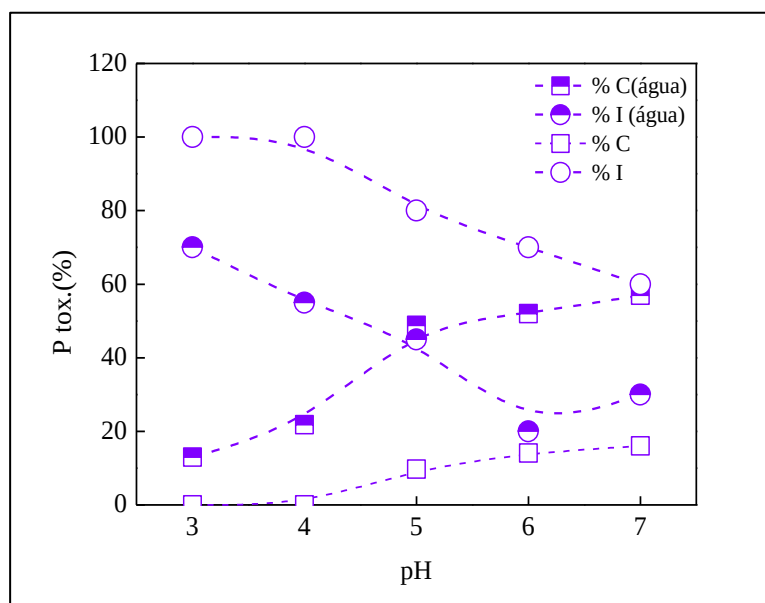


Figura 15- Parâmetros de toxicidade %I e %C em função do pH para águas-modelos contendo B20 (5% v/v) e LESS70 ($1,1 \times 10^{-2}$ g.cm⁻³).

Na Figura 15 os dados obtidos de %I para a Mistura B20 apresentaram 100% de inibição a germinação das sementes de alface para o pH3-4 com redução do percentual de sua toxicidade para um pH próximo a neutralidade pH7 (60±0,0), sendo considerado mais tóxico quando comparado ao B100 para o mesmo pH.

As águas modelos formuladas com 5% (v/v) de diesel e $1,1 \times 10^{-2}$ g.cm⁻³ de LESS70 em pH (faixa de 3 a 7) foram altamente tóxicas às sementes de alfaces apresentando 100% de inibição à germinação das sementes.

4.4 Biodegradação aeróbia dos Combustíveis

4.4.1 Estudo preliminar

Nos estudos preliminares investigou-se o processo de biodegradação aeróbia dos combustíveis (Diesel, B100 e da Mistura B20) dissolvidos em água na concentração de 5% (v/v) contendo o tensoativo LESS70 ($1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$), macro e micronutrientes por linhagens dos micro-organismos *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae*, não adaptados e adaptados. Foram mensuradas a concentração de células viáveis, pH, DQO, DBO_5 e a toxicidade.

Os resultados obtidos relacionados ao pH dos sistemas no processo de biodegradação para o período de 0-12 dias estão apresentados nas Figuras 16 e 17.

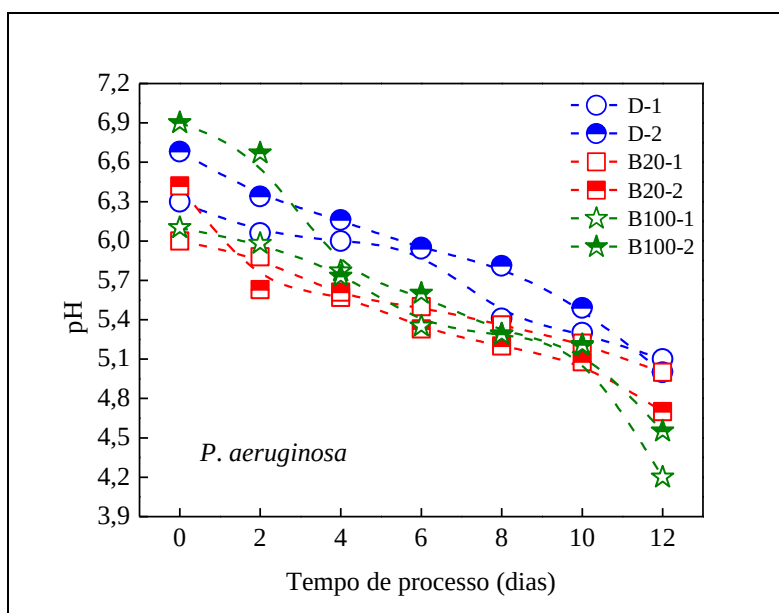


Figura 16- Evolução dinâmica do pH da fase líquida da mistura reagente para o Diesel (D), Mistura B20 e B100 pela *P. aeruginosa* não adaptada (D-1, B20-1 e B100-1) e *P. aeruginosa* adaptada (D-2, B20-2 e B100-2).

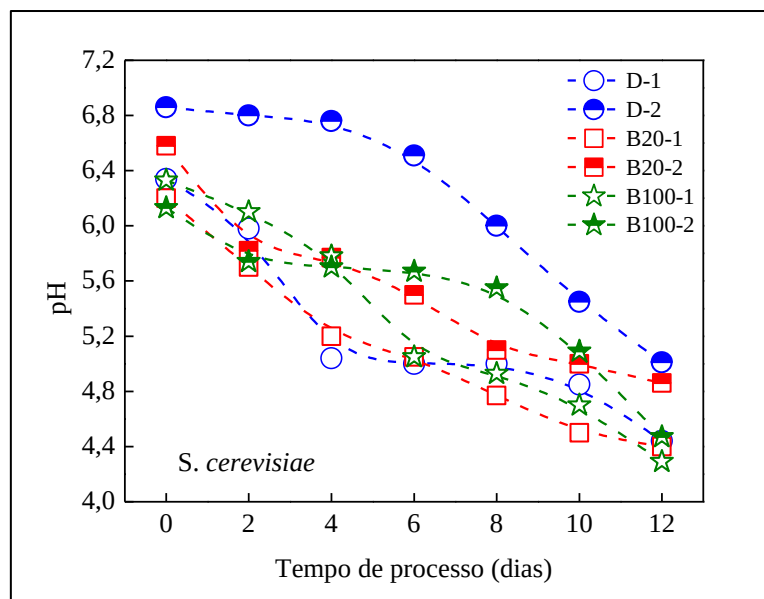


Figura 17- Evolução dinâmica do pH da fase líquida da mistura reagente para o Diesel, Mistura B20 e B100 pela *S. cerevisiae* não adaptada (D-1, B20-1 e B100-1) e *S. cerevisiae* adaptada (D-2, B20-2 e B100-2).

Em todos os ensaios realizados com a *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* com os diferentes combustíveis verificou-se uma redução do valor de pH. Dentre os combustíveis estudados, observou-se que o meio aquoso contendo o B100 foi o que apresentou uma maior redução de pH com valor máximo de 39,14% (6,90- 4,55), Figura 16. Quanto aos micro-organismos estudados, a *P. aeruginosa* adaptada apresentou melhor eficiência com relação a não adaptada. Com relação a linhagem de levedura, *S. cerevisiae* observou-se que a não adaptada apresentou maior redução de pH.

A redução do pH em sistemas de biodegradação de B100 pode ser seguramente utilizado como sensor de ocorrência de biodegradação dos EMAG C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2 que constituem a composição desses combustíveis. Estudos realizados por diferentes autores também afirmam que, além dos aceptores de elétrons, outras variáveis podem ser relacionadas a processos biológicos, como o pH e o potencial redox (VROBLESKY & CHAPELLE, 1994; BORDEN *et al.*, 1995; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996; AZADPOUR-KEELEY *et al.*, 1999; WALT & McNAB, 1999; KAO & WANG, 2000; BHUPATHIRAJU *et al.*, 2002; RÖLING & VERSEVEL, 2002; SILVA *et al.*, 2002; CHEON & LEE, 2004). Segundo Videla (1994), os metabolitos ácidos provenientes do metabolismo microbiano do óleo diesel têm sido apontados como um fator que reduz o pH da fase aquosa.

As Figuras 18 e 19 mostram a evolução dinâmica da concentração de células viáveis para a *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae*, respectivamente.

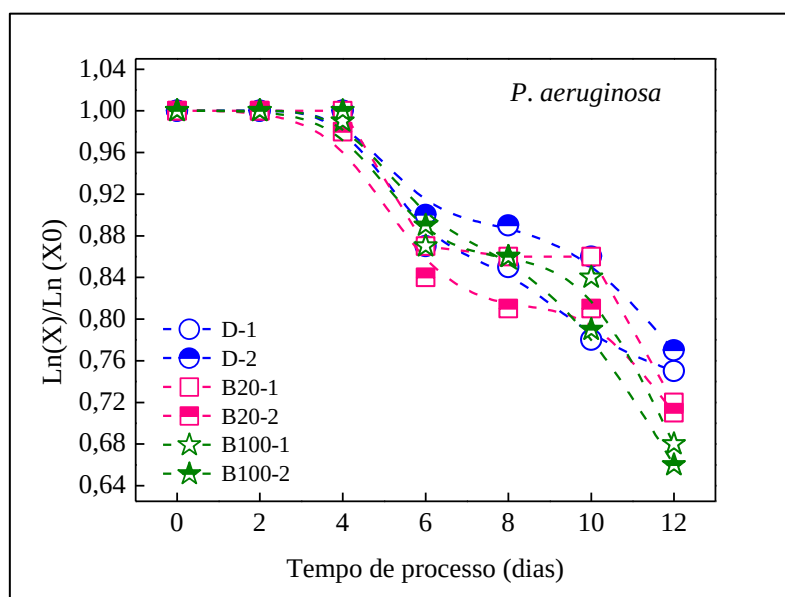


Figura 18- Evolução dinâmica da concentração de biomassa da *P. aeruginosa* não adaptada (D-1, B20-1 e B100-1) e *P. aeruginosa* adaptada (D-2, B20-2 e B100-2).

O perfil cinético da *P. aeruginosa* (Figura 18) em todos os combustíveis testados mostra que a *P. aeruginosa* manteve uma concentração máxima e constante das células viáveis (ordem da concentração foi igual a 7 UFC.cm^{-3}) por um período de 4 dias de processo.

Apresentando redução da concentração de células viáveis a partir do 4º dia com decrescimento da população (ordem da concentração foi igual a 6 UFC.cm^{-3}) de células viáveis e ao final do processo (ordem da concentração foi igual a 5 UFC.cm^{-3}).

Salienta-se, entretanto, que a cultura adaptada apresentou uma menor redução da população microbiana até o 6º dia de processo e a partir deste período, houve uma redução mais acentuada da concentração microbiana em ambas as culturas (não adaptada e adaptada).

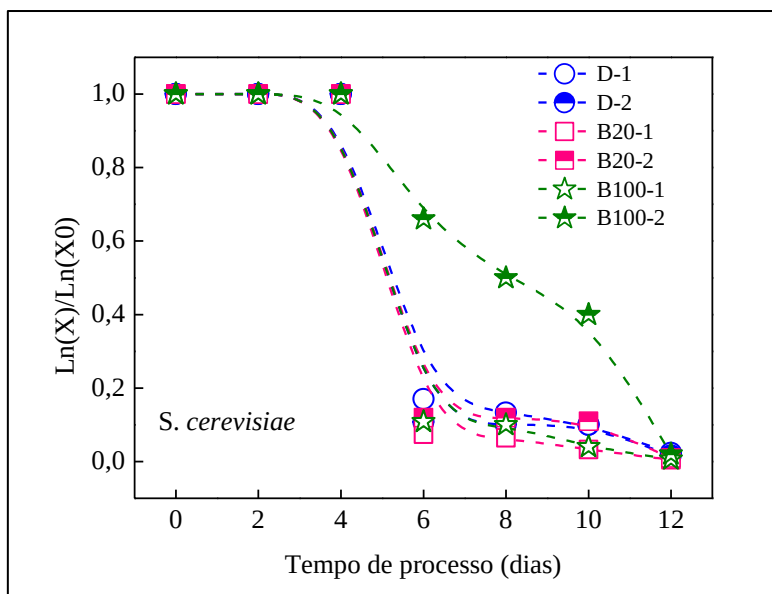


Figura 19- Evolução dinâmica da concentração de biomassa da *S. cerevisiae* não adaptada (D-1, B20-1 e B100-1) e *S. cerevisiae* adaptada (D-2, B20-2 e B100-2).

Comparando-se o perfil cinético da *S. cerevisiae* (Figura 19) com a *P. aeruginosa* observa-se que até o 4º dia de processo houve permanência da concentração no valor máximo (ordem da concentração foi igual a 7 UFC.cm⁻³) sendo o mesmo observado para a bactéria. Mas, a partir do 6º dia de processo observa-se redução drástica da concentração de células viáveis (ordem da concentração foi igual a 6 UFC.cm⁻³) para todos os combustíveis exceto para o combustível B100 com a *S. cerevisiae* adaptada. Neste caso o perfil cinético foi semelhante ao obtida com a *P. aeruginosa* apenas para o B100.

As concentrações de ambos os micro-organismos ao 12º dia de processo permaneceu com (ordem da concentração foi igual a 5 UFC.cm⁻³). Apesar da biodegradação dos combustíveis pelos micro-organismos resultarem em produtos de caráter ácido, a morte celular não pode ser atribuída a este fato pois ambos os micro-organismos segundo Pelczar *et al.* (1997) sobrevivem na faixa de pH de 5 a 9 e 4 a 5 para a bactéria e levedura, respectivamente. Possivelmente, a morte celular ocorreu devido aos componentes tóxicos que fazem parte da composição dos combustíveis.

As Figuras 20, 21 e 22 mostram a evolução dinâmica da biodegradabilidade dos combustíveis em termos da relação DQO/DBO₅ para a *P. aeruginosa* *S. cerevisiae*.

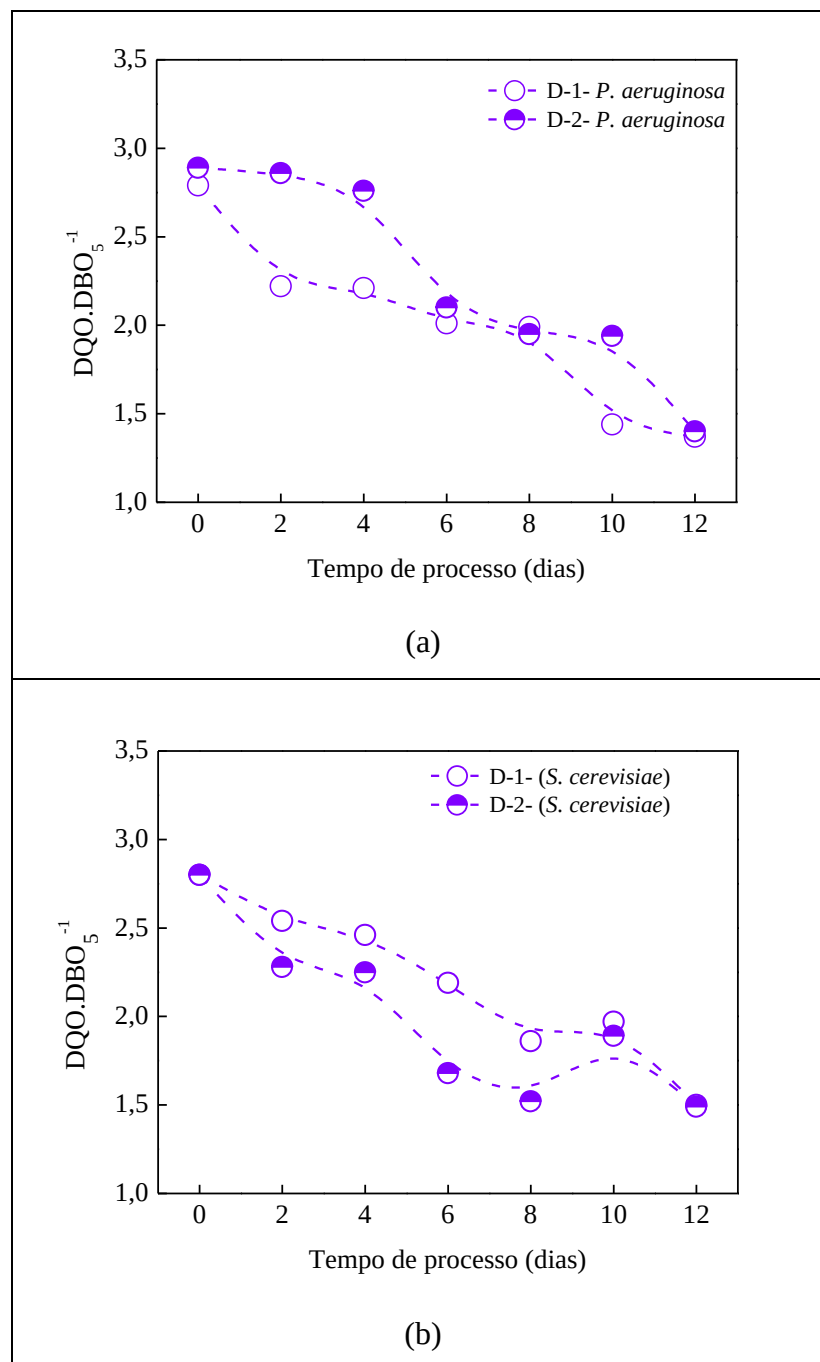


Figura 20- Evolução dinâmica da biodegradabilidade do diesel em termos da relação DQO/DBO₅ do meio líquido pela *P. aeruginosa* [não adaptada (D-1) e adaptada (D-2)] (a) e *S. cerevisiae* [não adaptada (D-1) e adaptada (D-2)] (b).

Observa-se na Figura 20 que, inicialmente a concentração da matéria orgânica era muito alta, com elevados índices de DQO para o diesel (Figura 20). Também pode ser visto que ao 12º dia da biodegradação do diesel houve uma maior variação de percentual para o processo contendo a bactéria adaptada (49,10%). Segundo Jardim & Canela (2004) um composto químico pode ser considerado biodegradável quando $2,5 < \text{DQO/DBO}_5 < 5,0$. Neste trabalho verificou-se que a relação DQO/DBO₅ passou de 2,79

para 1,37 após 12 dias de processo, indicando que inicialmente o composto era biodegradável (2,79) e após a ação do micro-organismo no combustível a relação tornou-se 1,37; evidenciando a remoção da matéria orgânica. Para o processo de biodegradação do diesel na presença da levedura adaptada este fato também foi evidenciado com a redução de 53,57% e relação DQO/DBO₅: 1,50 ao 12º dia de processo. Nos combustíveis (B100 e B20) para os micro-organismos estudados (Figura 21 e 22) verificou-se o mesmo comportamento quanto à remoção da matéria orgânica.

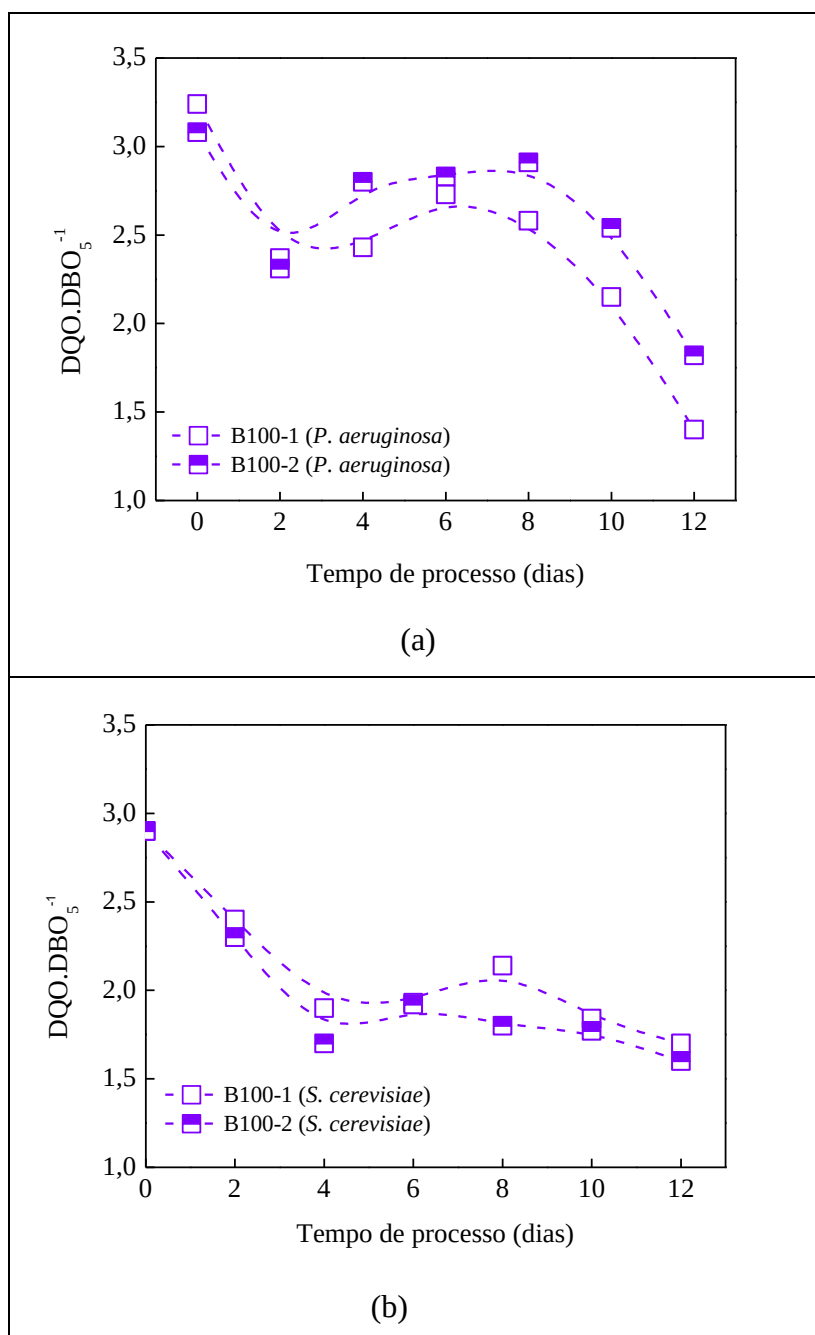


Figura 21- Evolução dinâmica da biodegradabilidade do B100 em termos da relação DQO/DBO₅ do meio líquido pela *P. aeruginosa* [não adaptada (B100-1) e adaptada (B100-2)] (a) e *S. cerevisiae* [não adaptada (B100-1) e adaptada (B100-2)] (b).

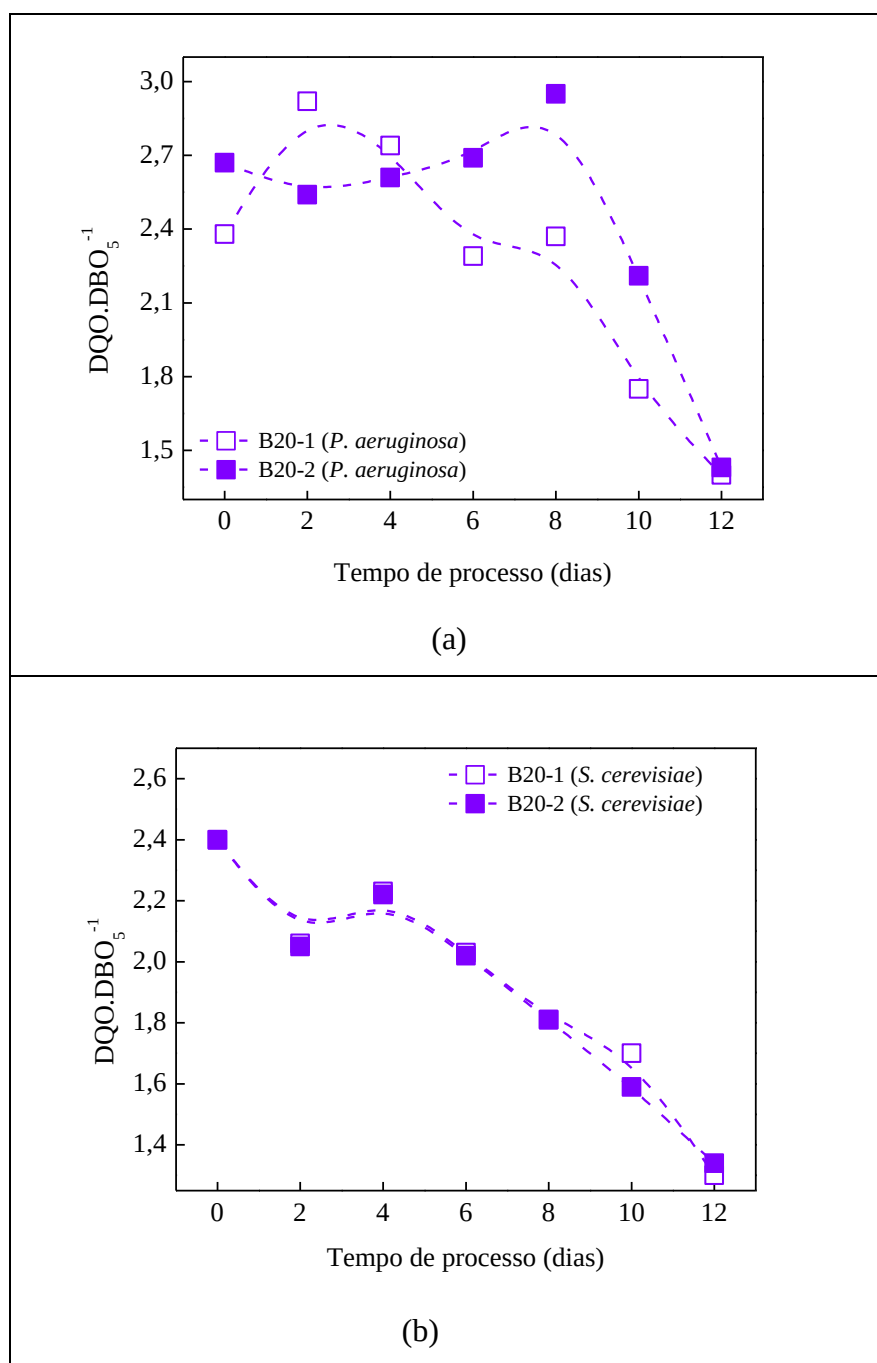


Figura 22- Evolução dinâmica da biodegradabilidade do B20 em termos da relação DQO/DBO₅ do meio líquido pela *P. aeruginosa* [não adaptada (B20-1) e adaptada (B20-2)] (a) e *S. cerevisiae* [não adaptada (B20-1) e adaptada (B20-2)] (b).

A Tabela 7 mostra os percentuais de remoção da matéria orgânica durante o processo de biodegradação dos combustíveis estudados.

Tabela 7- Percentual de remoção da matéria orgânica.

Combustíveis	Micro-organismos			
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	Não adaptada	Adaptada	Não adaptada	Adaptada
Diesel	48,44%	49,10%	53,21%	53,57%
B100	59,09%	60,71%	55,17%	58,62%
B20	53,55%	60,08%	55,83%	54,16%

De acordo com a Tabela 7, observa-se que todos os combustíveis foram degradados pelos micro-organismos nas diferentes condições de cultivo, sendo que a eficiência do processo de biodegradação dos combustíveis se comporta da seguinte forma: biodiesel (B100) > Mistura B20 > diesel, o que já era previsto devido a composição dessas misturas de compostos orgânicos.

A bactéria *P. aeruginosa* adaptada foi o micro-organismo que apresentou um maior percentual de remoção da matéria orgânica com cerca de (~ 61%) de eficiência.

As Figuras 23, 24 e 25 mostram a evolução dinâmica dos parâmetros de toxicidade, percentual de crescimento da raiz (%C), percentual de inibição da germinação da semente de alface (% I) da fase líquida da mistura reagente dos combustíveis (Diesel, B100 e da Mistura B20) na concentração de 5% (v/v) dissolvidos em água.

Os produtos metabólitos resultantes da degradação deste combustível pela levedura *S. cerevisiae* tem um grau de toxicidade mais elevado do que os metabólitos resultantes da biodegradação pela bactéria *P. aeruginosa* (Figura 23 a e Figura 23 b).

Em estudo realizado por Tamada (2013) o diesel se mostrou mais tóxico nos tempos iniciais dos bioensaios o que pode estar relacionado ao fato confirmado por Adam & Ducan (2002), que o diesel envolve as sementes criando assim, uma barreira física impedindo trocas gasosas e entrada de água, dificultando sua germinação.

Segundo Ogbo (2009), o diesel interfere também no crescimento da raiz, fato esse confirmado pela diferença significativa de crescimento em relação ao controle negativo em alguns casos.

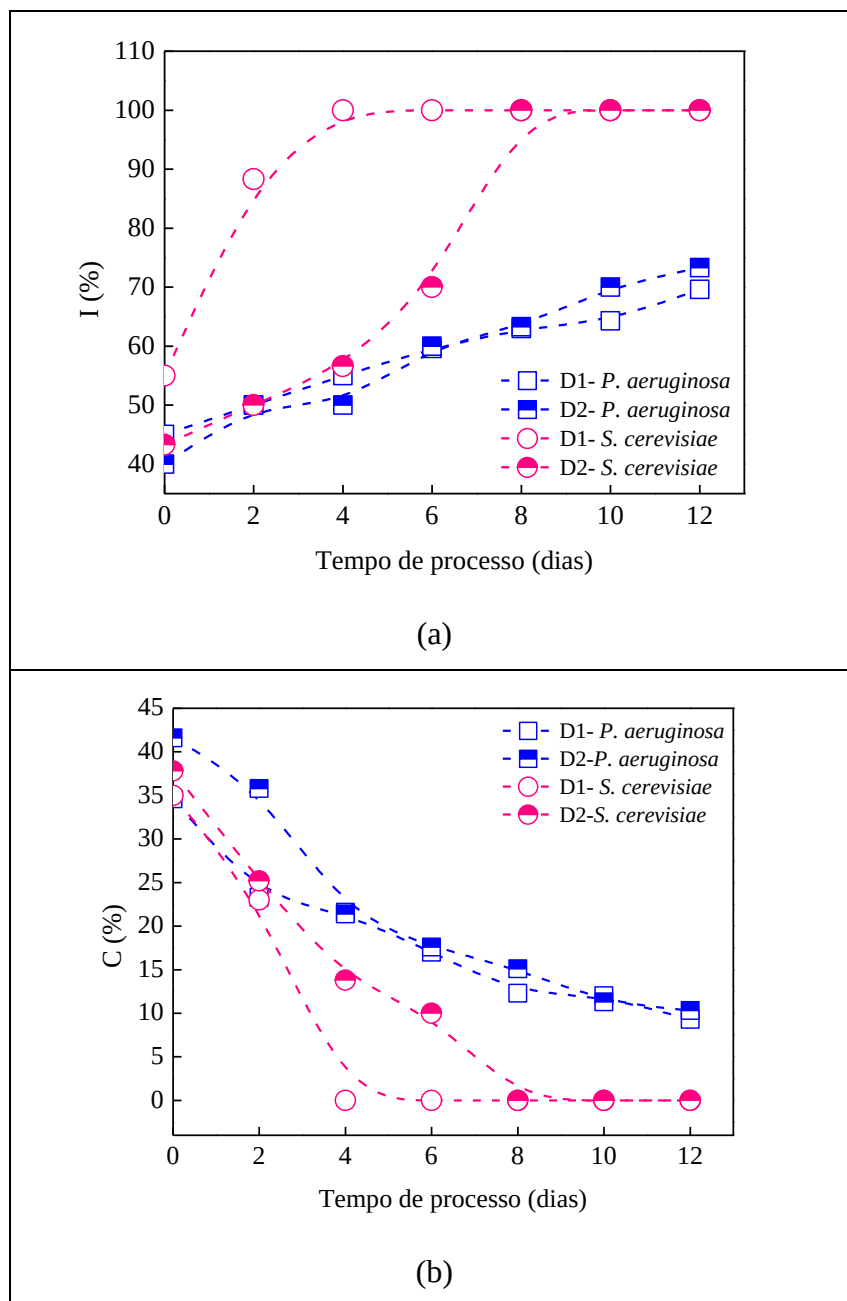


Figura 23- Parâmetros de toxicidade de C% e %I da fase líquida da mistura reagente para o Diesel e $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70, [D1- *P. aeruginosa*, D2- *P. aeruginosa*] (a) e [D1- *S. cerevisiae*, D2- *S. cerevisiae*] (b).

Observa-se ainda que os produtos da biodegradação do diesel pela *S. cerevisiae* não adaptada após o 4º dia de processo apresentaram 100% de inibição do crescimento das sementes de alface. Com a *S. cerevisiae* adaptada apenas a partir do 8º dia de processo é que houve 100% de inibição à germinação e enfraquecimento de suas raízes ao final do processo de biodegradação do diesel. Para a *P. aeruginosa* a cultura adaptada apresentou perfil de comportamento semelhante à não adaptada, com uma diferença percentual de 30% com relação à levedura *S. cerevisiae*.

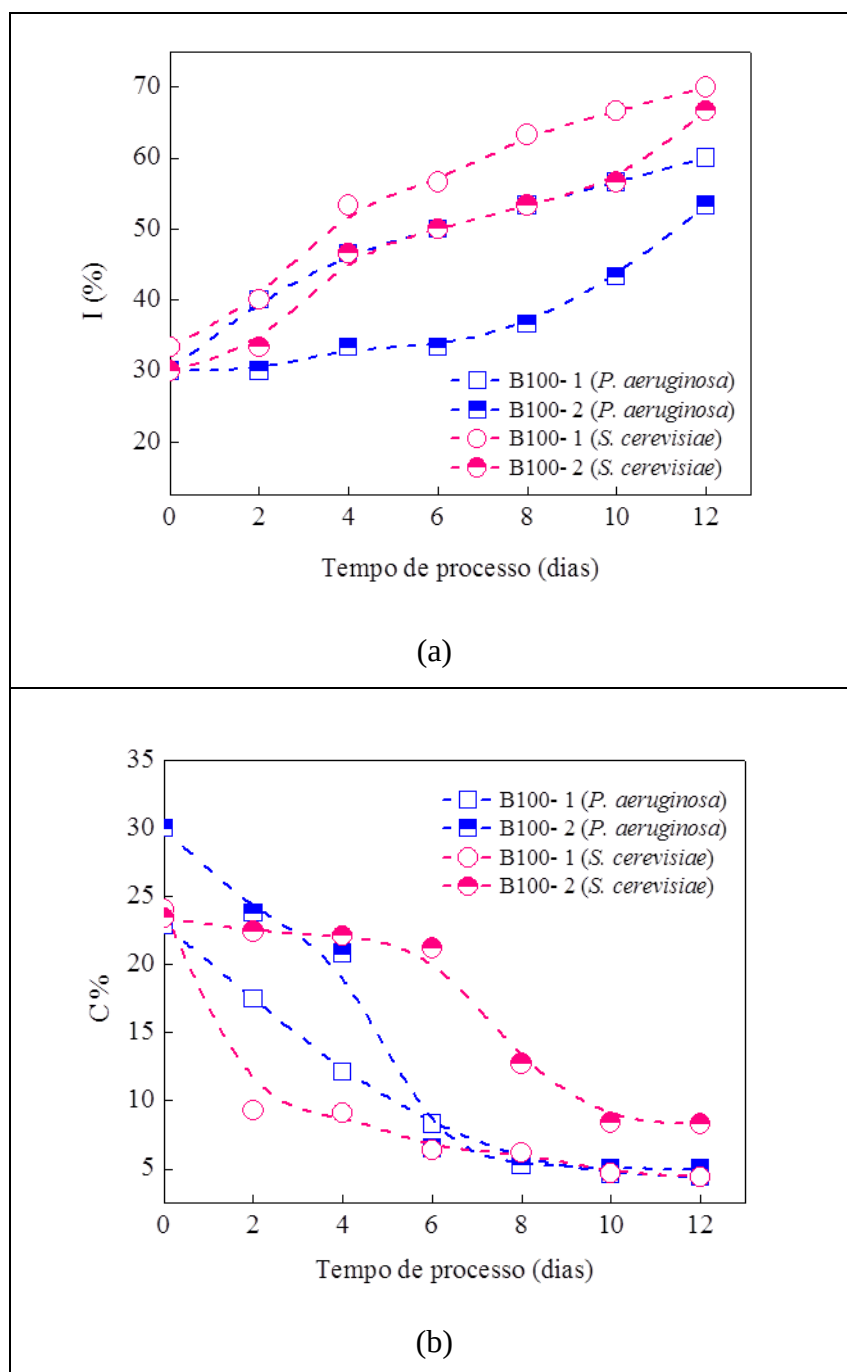


Figura 24- Parâmetros de toxicidade de C% e %I da fase líquida da mistura reagente para o B100 e $1,1 \times 10^{-2}$ g.cm⁻³ de LESS70, [B100-1 *P. aeruginosa*, B100-2 *P. aeruginosa*] (a) e [B100-1- *S. cerevisiae*, B100-2 *S. cerevisiae*] (b).

As Figuras 24 e 25 mostram que inicialmente o meio foi considerado levemente tóxico à semente de alfaca (%I ≤ 40%) passando a tornar-se tóxico a partir do 4º dia de processo. Ao 12º dia de processo da biodegradação do B100, os produtos mostraram-se mais tóxicos com maior enfraquecimento das raízes das sementes de alfaca, para as culturas não adaptadas.

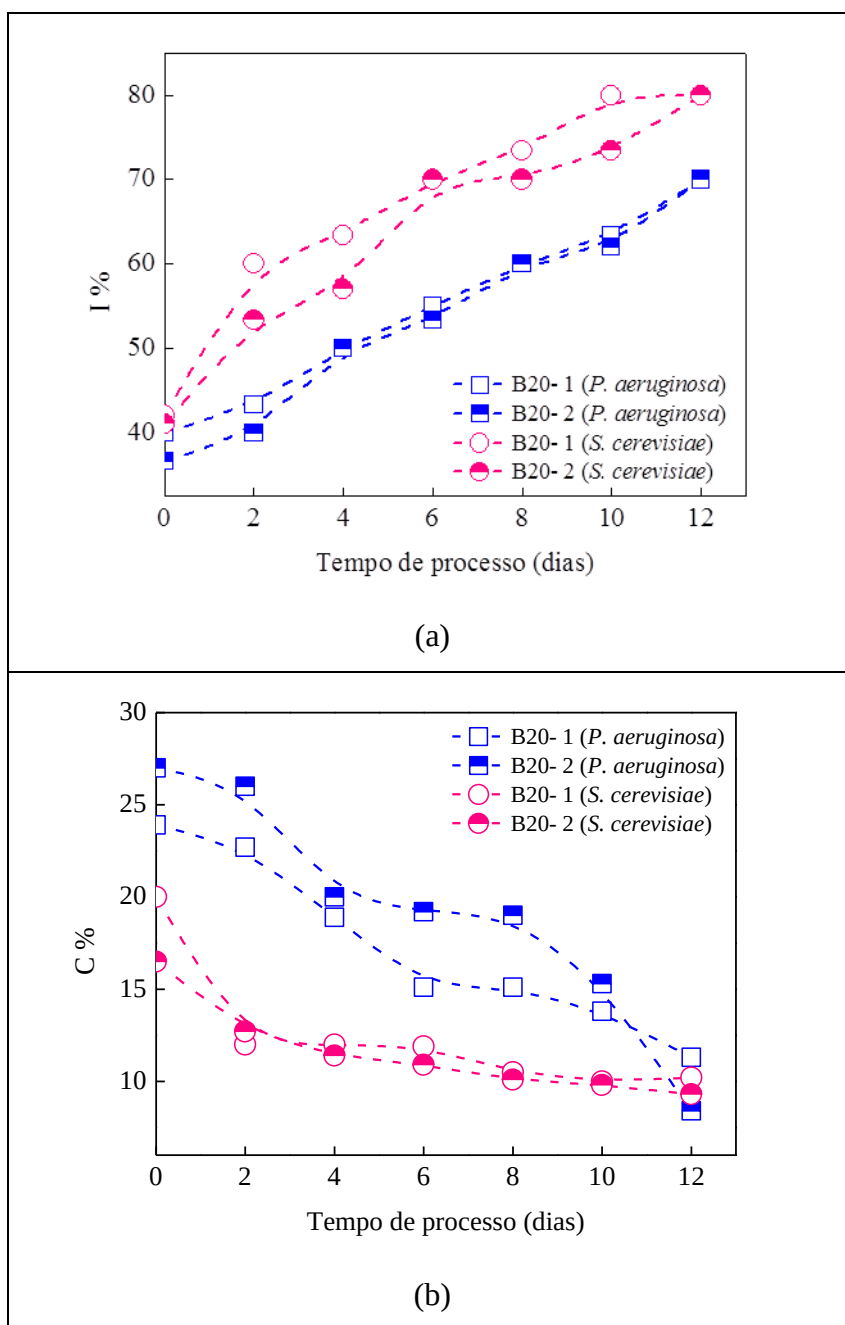


Figura 25- Parâmetros de toxicidade de C% e %I da fase líquida da mistura reagente para o Mistura B20 e $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70, [B20-1 *P. aeruginosa*, B20-2 *P. aeruginosa*] (a) e [B20-1- *S. cerevisiae*, B20-2 *S. cerevisiae*] (b)].

Para os resultados apresentados nas Figuras 26 (a) e 26 (b) o percentual de inibição da germinação, as sementes de alface aumentaram para ambas as linhagens, no entanto, ao 12º dia de processo, os produtos obtidos pela biodegradação do B20 pela levedura mostraram-se mais tóxicos às sementes com maior redução do percentual de crescimento das raízes.

4.5 Estudo do Processo de Biodegradação em Biorreator Tipo Tanque

4.5.1 Cinética de Biodegradação

Nesta etapa os experimentos foram realizados em biorreator de bancada Biostat[®] B, empregando o processo em batelada, utilizando a bactéria *P. aeruginosa* adaptada, a qual foi escolhida nos estudos preliminares como um micro-organismo mais eficiente em biodegradar os combustíveis e com menor potencial de toxicidade à semente de alfafa. O estudo no biorreator se fez necessário devido às condições hidrodinâmicas, e implicitamente as de transferência de matéria por apresentarem-se comportamento diferente quando comparadas ao dos estudos em balões de fundo chato.

A biodegradação do óleo diesel está bem explorada na literatura (Souza *et al.*, 2009), havendo a necessidade de investigar a biodegradação do biodiesel puro (B100) e de suas misturas com o diesel.

Os resultados encontrados para os valores iniciais das concentrações dos EMAG C16:0 e C18:2, do pH, de células viáveis, da relação indicadora de biodegradabilidade (RB = DQO/DBO₅) dos combustíveis B100 e Mistura B20 dissolvidos em água com 5% v/v destes e $1,1 \times 10^{-2}$ g.cm⁻³ de LESS70, estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Valores iniciais para os parâmetros do processo de biodegradação dos combustíveis B100 e Mistura B20.

Combustível	Biomassa ($\times 10^{-7}$) (UFC.cm ⁻³)	pH	C16:0 (% g/g)	C18:2 (% g/g)	RB (DQO/DBO ₅)
B100 (Ensaio 1)	3,0	6,5	24,95	58,94	3,0
B100 (Ensaio 2) (C:N de 50:1)	1,0	6,5	25,91	58,20	3,0
Mistura B20 (Ensaio 3) (C:N de 50:1)	2,0	6,3	-	-	3,67

As Figuras 26 (a) e 26 (b) apresentam as curvas de decaimento dos principais ésteres metílicos palmítico (C16:0) e linoléico (C18:2) presentes na composição do biodiesel no processo de biodegradação do biodiesel pela *P. aeruginosa* sem (Ensaio1) e com a adição suplementar de KNO₃ ao meio MCM (Ensaio 2).

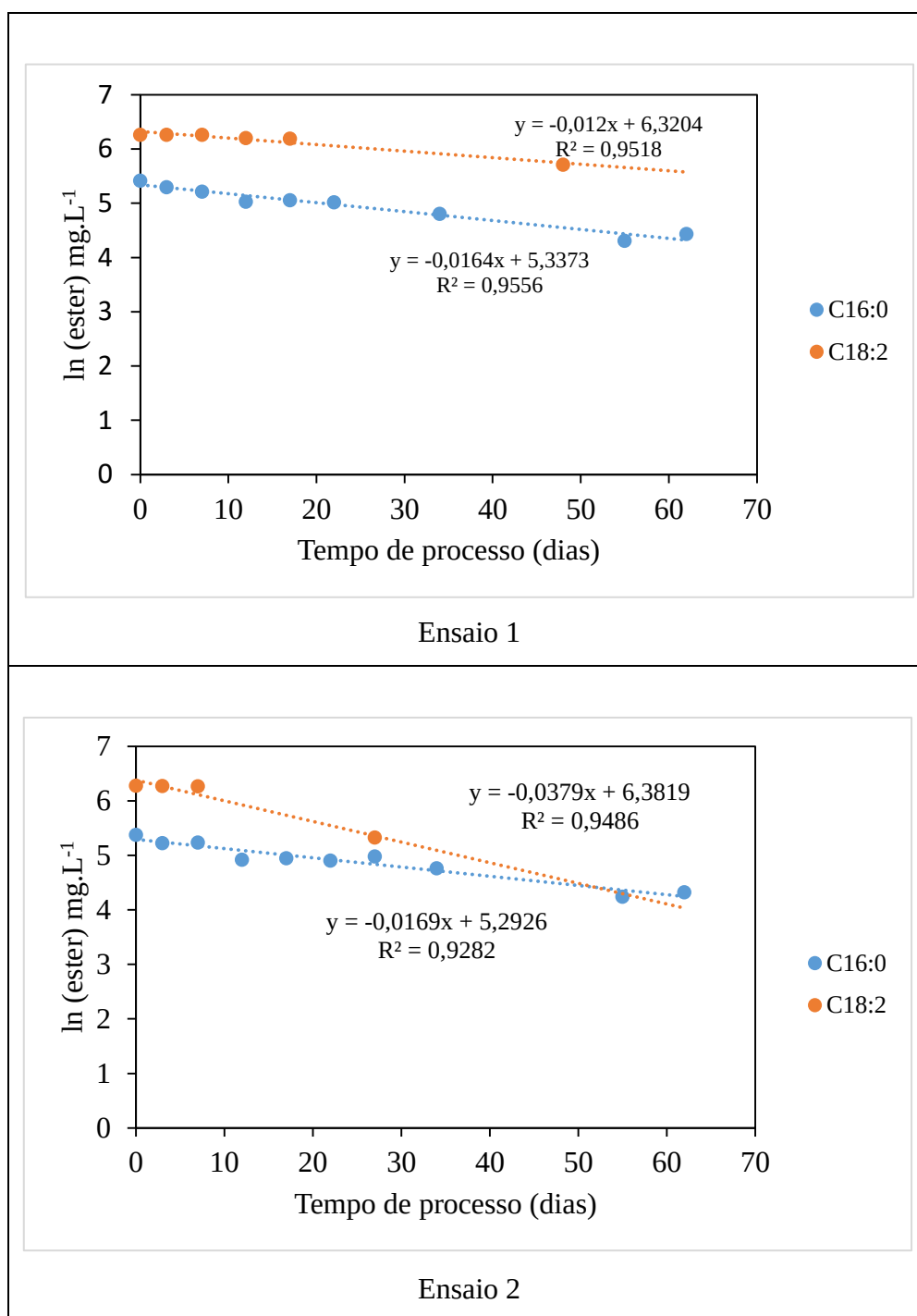


Figura 26- Curva de decaimento de primeira ordem dos principais ésteres (C16:0) e (C18:2) presentes no biodiesel de algodão ao longo do processo de biodegradação. (5% v/v de B100; $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70); 30° C ; 250 rpm; 0,5 v.v.m de ar. Ensaio1: B100 sem adição suplementar de KNO_3 e Ensaio 2: B100 com adição suplementar de KNO_3 .

As cinéticas de biodegradação do biodiesel de algodão apresentaram diminuição da concentração dos principais ésteres metílicos de ácidos palmítico (C16:0) e linoléico (C18:2) com perfil cinético de decaimento de reação de primeira ordem. Nos Ensaio 1 e 2, a cinética de biodegradação foi mais rápida para o éster linoléico (C18:2), comparada

ao éster palmítico (C16:0). Esta diferença pode estar relacionada à maior instabilidade estrutural do éster linoleico presente no biodiesel de algodão.

A estabilidade dos ésteres de ácidos graxos diminui à medida que o número de carbonos e ramificações aumenta na cadeia, valendo então a seguinte relação entre a instabilidade estrutural dos EMAG: a) EMAG-Ins > EMAG-Sat; b) EMAG-Ins (3 Ins) > EMAG-Ins (2 Ins) > EMAG-Ins (1 Ins), onde “n Ins” representa número de insaturações presentes na molécula do éster. Este fato ficou comprovado no presente trabalho e em estudo realizado por Gomes (2008) relacionado à biodegradação do biodiesel puro. Gomes (2008), em seu trabalho observou características diferentes de degradação em diferentes biodiesel sendo observada uma degradação mais rápida no biodiesel de soja do que no de mamona. Este fato se deve as diferenças nas composições dos respectivos biocombustíveis.

A Figura 27 apresenta o percentual de degradação dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes na composição do biodiesel pela *P. aeruginosa* ao final do período de 62 dias no processo de biodegradação do biodiesel.

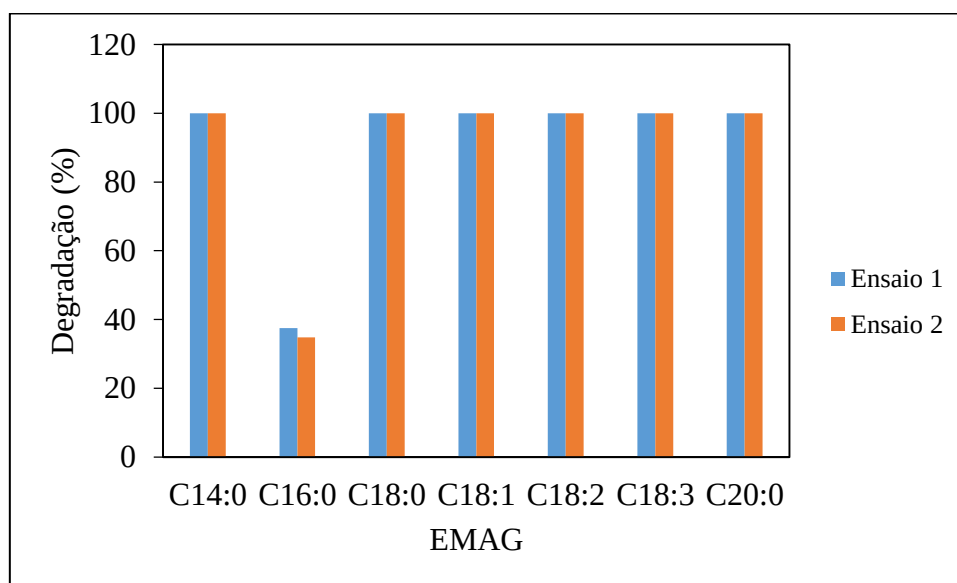


Figura 27- Percentual de biodegradação dos EMAG constituintes do biodiesel de algodão.

Neste estudo com relação aos ésteres metílicos, obteve-se degradação de 37,51% e 34,82% para o C16:0 nos Ensaios 1 e 2, respectivamente. Com relação aos demais ésteres houve degradação de 100% para ambos os ensaios.

No estudo realizado por Gomes (2008), foi observado que mais de 86% do biodiesel de soja já havia sido degradado em 41 dias, no entanto o biodiesel de mamona foi necessário 92 dias para que ocorresse 42% de degradação.

A Tabela 9 apresenta os coeficientes de biodegradação dos principais ésteres metílicos palmítico (C16:0) e linoléico (C18:2) do biodiesel de algodão.

Tabela 9- Coeficientes de decaimento de biodegradação dos ésteres metílicos (C16:0) e (C18:2).

Combustível	λ (dia ⁻¹)	
	C16:0	C18:2
B100 (Ensaio 1)	0,0164	0,012
B100 (Ensaio 2)	0,0169	0,0379

Os valores dos coeficientes de biodegradação (dia⁻¹) desses ésteres metílicos foram menores do que os encontrados por Gomes (2008) os quais apresentam como resultado de 0,04 para o palmítico e 0,06 para o linoleico para o biodiesel de soja.

Os tempos de meia vida para o processo de biodegradação dos principais ésteres metílicos palmítico (C16:0) e linoléico (C18:2) do biodiesel de algodão são mostrados na Tabela 10. Observou-se que o composto com maior número de ligações insaturadas (linoléico) foi o que apresentou um maior coeficiente de biodegradação, levando menos tempo de meia-vida (em dias) para serem degradados.

Tabela 10- Tempo de meia vida no processo de biodegradação dos ésteres metílicos (C16:0) e (C18:2).

Combustível	T ½ (dias)	
	C16:0	C18:2
B100 (Ensaio 1)	42,26	57,76
B100 (Ensaio 2)	41,01	18,28

Gomes (2008) estudou a biodegradação anaeróbia do biodiesel de soja e mamona em ambiente aquático e encontraram um tempo de meia-vida para os ésteres metílicos contidos no biodiesel de soja de 11 dias (linoleico e linolênico), 16 dias (oleico), 18 dias (palmítico) e 116 dias (esteárico). Já para esses ésteres metílicos contidos no biodiesel de mamona o tempo de meia-vida foi de 116 dias para o palmítico, 139 dias para o linoleico e linolênico, e 173 dias para o oleico e esteárico. Portanto, pode-se concluir que a degradabilidade está relacionada a biomassa utilizada como matéria-prima para a produção do biodiesel.

Miller & Mudge (1997) também observaram que alguns ésteres metílicos de ácidos graxos (C18) insaturados eram degradados mais rapidamente do que os ésteres metílicos de ácidos graxos saturados, em experimentos que focavam determinar a efetividade do biodiesel na remediação de derramamentos de óleo cru no meio ambiente. Lalman & Bagley (2001) concluíram que a degradação de ácidos insaturados (linoléico e oléico) é mais favorável energeticamente do que para ácidos saturados.

O estudo da cinética de biodegradação de compostos orgânicos possibilita estimar a persistência dos contaminantes no ambiente e prever a variação de suas concentrações no tempo. Os comportamentos dinâmicos do pH para o processo de biodegradação dos B100 e Mistura B20 dissolvidos em água estão mostrados na Figura 28.

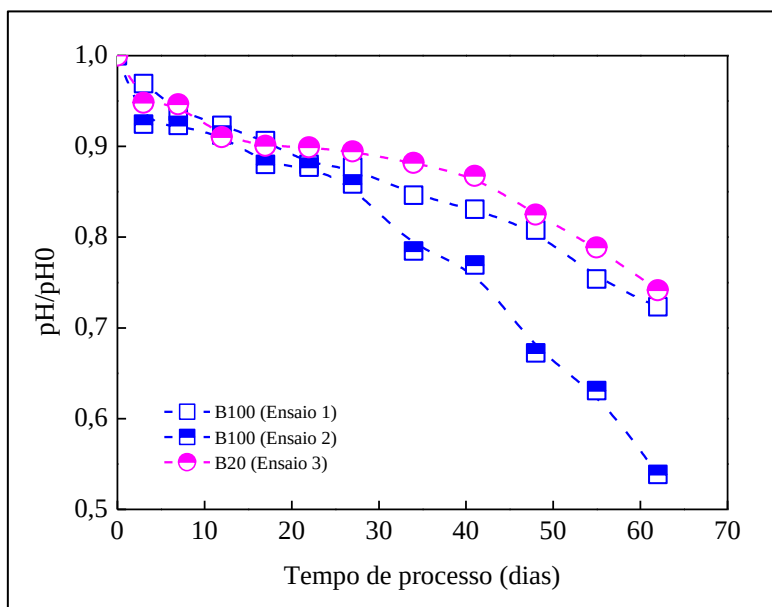


Figura 28- Evolução dinâmica do pH na biodegradação dos combustíveis dissolvidos em água (5% v/v de B100/B20; $1,1 \times 10^{-2}$ g.cm⁻³ de LESS70; 30° C; 250 rpm; 0,5 v.v.m de ar).

O decréscimo do valor de pH ao longo do processo de biodegradação dos combustíveis B100 e Misturas B20 dissolvidos em água, indica que houve produção de compostos de caráter ácido, sendo, portanto, um indicador de que o combustível/poluinte está sendo biodegradado ao longo do processo.

Segundo Leahy & Colwell (1990), valores de pH entre 6,0 e 8,0 são os mais favoráveis para a ação de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos do petróleo.

Para o intervalo de tempo 0 a 27 dias, nota-se uma redução do pH mais acentuada (14,15%) para B100 (Ensaio 2) e moderada para o B100 (Ensaio 1) e Mistura

B20 (Ensaio 3) com valores de 12,3% e 10,56%, respectivamente. O processo de biodegradação apresentou-se na ordem: B100 (Ensaio 2) > B100 (Ensaio 1) > Mistura B20 (Ensaio 3). Tais resultados sugerem que a adição do KNO_3 , na proporção C:N 50:1 no 7º dia, beneficiou a biodegradação do biodiesel (Ensaio 2).

Este resultado era esperado, visto que, aumentos na concentração de nitrogênio no meio aquoso, favorecem a nutrição do micro-organismo e por consequência a biodegradação, com maior produção de ácidos intermediários (ATLAS,1984).

A diminuição do pH do meio é, provavelmente, devido à produção de metabólitos ácidos, decorrentes do processo de biodegradação (GOMES, 2004).

Os valores de pH ao final do processo de biodegradação do biodiesel de algodão no Ensaio 1 (4,70) e Ensaio 2 (3,50) e Ensaio 3 (4,70), apresenta não conformidade aos valores recomendados pela Resolução CONAMA 357/05, que fixa o pH entre 5 a 9 para condições de lançamento de efluentes.

Este fato ficou comprovado em estudo realizado por Grangeiro (2009), em estudo sobre a caracterização da água de lavagem proveniente da purificação do biodiesel.

A eficiência do processo de biodegradação de um poluente também está associada ao comportamento das células viáveis no meio onde ocorre a degradação, que por sua vez depende, de forma complexa, da composição do meio, das características hidrodinâmica e transferência de massa no biorreator.

As evoluções dinâmicas da concentração de células viáveis da bactéria *P. aeruginosa* adaptada aos combustíveis B100 e Mistura B20, na concentração de 5% v/v, para as condições sem (Ensaio 1) e com adição suplementar de KNO_3 a partir do dia 7º do processo (Ensaio 2 e 3), estão apresentadas na Figura 29.

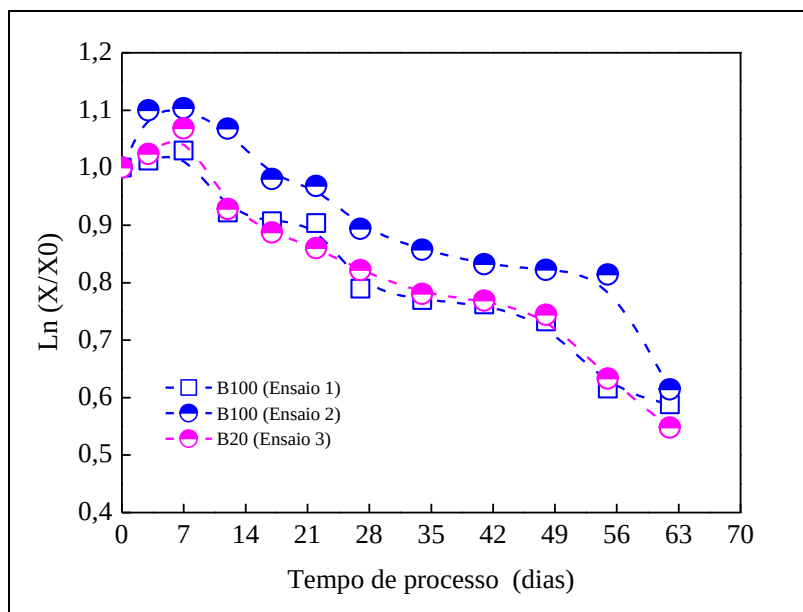


Figura 29- Evolução dinâmica da concentração da biomassa microbiana para o processo de biodegradação dos B100 e Mistura B20 (5% v/v de B100/B20; $1,1 \times 10^{-2}$ g.cm⁻³ de LESS70; 30° C; 250 rpm; 0,5 v.v.m de ar).

Nas condições operacionais estudadas, as curvas referentes às evoluções dinâmicas da concentração de células viáveis apresentaram comportamento similares, mesmo ocorrendo a adição suplementar de KNO₃ no dia 7º do processo ($3,0 \times 10^7$ UFC.cm⁻³). O biodiesel apresenta uma configuração vantajosa, no que se diz respeito a sua biodegradabilidade, pois sua estrutura molecular é susceptível ao ataque enzimático que utilizará o biodiesel como substrato para crescimento (SILVA *et al.*, 2005).

Ainda com relação ao crescimento da bactéria adaptada, pode-se observar que não houve uma fase lag aparente (Figura 29), demonstrando que a execução prévia de um processo de adaptação é de suma importância para aumentar a eficiência da taxa de degradação dos combustíveis. Este fato ficou comprovado em estudo realizado por Almeida *et al.* (2013) relacionado à biodegradação do óleo combustível (*bunker*) pelo consórcio de linhagens aclimatadas.

Em diversos trabalhos, a relação C:N foi encontrada como um dos fatores que mais favorece o processo de degradação de hidrocarbonetos (MOLINABARAHONA *et al.*, 2004; SASAKI *et al.*, 2003). Segundo Silva (2012) a relação C:N de 50:1 é a composição que proporciona uma maior degradação de hidrocarbonetos do óleo diesel, sendo este fato confirmado pelo aumento gradual de biomassa com uma redução (acima de 69%) dos n-alcanos da faixa de C9 a C21 e diminuição da toxicidade (germinação acima de 65%).

No entanto, no presente estudo a adição suplementar do KNO_3 através da relação C:N de 50:1 não proporcionou um aumento da concentração da biomassa verificando-se inclusive uma diminuição da população ao longo do processo degradativo.

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e a demanda química de oxigênio (DQO) pode também ser utilizada para análise da tratabilidade biológica de um efluente, comumente chamada de biodegradabilidade. Quanto maior o valor da DBO, maior a labilidade biológica dos compostos orgânicos presentes num dado efluente. Por outro lado, a recalcitrância desta mesma carga orgânica pode ser avaliada pela demanda química de oxigênio, a qual é obtida após uma oxidação drástica da matéria orgânica (JARDIM & CANELA, 2004). Desta maneira, a diminuição da DQO e o aumento da DBO, ou, ainda, a relação DQO/DBO pode informar a respeito da eficiência da degradação da carga orgânica presente.

A Figura 30 mostra a evolução dinâmica da relação DQO/DBO₅ da fase líquida da mistura reagente para o processo de biodegradação dos B100 e Mistura B20.

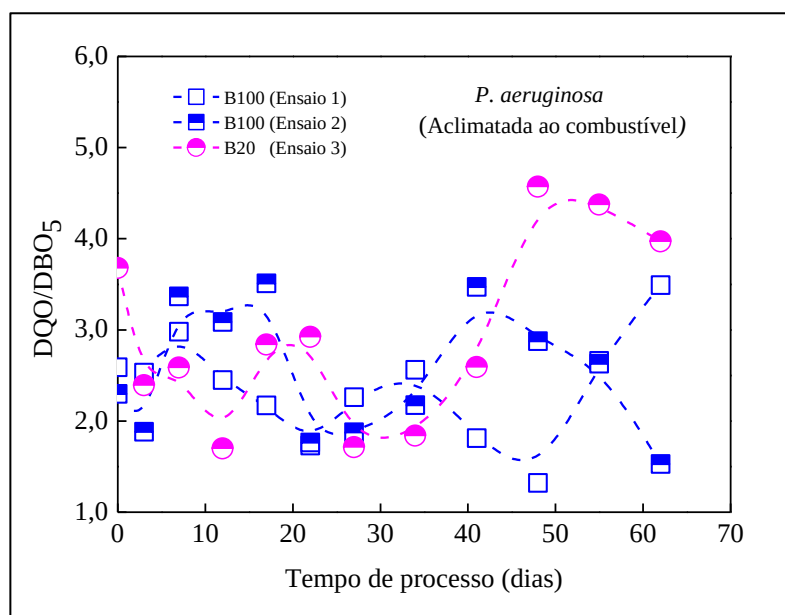


Figura 30- Evolução dinâmica da relação DQO/DBO₅ da fase líquida da mistura reagente para o processo de biodegradação dos B100 (5% v/v de B100/B20; $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70; 30° C; 250 rpm; 0,5 v.v.m de ar).

Para um dado efluente, se a relação DQO/ DBO < 2,5 o mesmo é facilmente biodegradável. Se a relação $5,0 < \text{DQO/DBO} \leq 2,5$ este efluente irá exigir cuidados na escolha do processo biológico para que se tenha uma remoção desejável de carga orgânica, e se DQO/DBO > 5, então o processo biológico tem muito pouca chance de

sucesso, e a oxidação química aparece como um processo alternativo (JARDIM & CANELA, 2004). Os resultados da relação DQO/DBO₅ mostram que houve remoção da matéria orgânica de 49,00% no Ensaio 2. Os resultados para o Ensaio 3 apresentaram aumento dos valores dessa relação ao final do processo. Este fato não está de acordo com o estudo de Mello *et al.* (2007) quanto a degradação microbiana de misturas de biodiesel com diesel e somente diesel em microcosmos preparados com água do mar, concluíram que a presença dos ésteres de ácidos graxos diminuía a biodegradação inicial dos n-alcenos do diesel de petróleo. Ainda há poucos estudos encontrados na literatura, tentando elucidar possíveis efeitos biológicos gerados pela contaminação de biodiesel (FINCH *et al.*, 2002; VARSHO, 1996a, b e POON *et al.*, 2007).

Os testes de toxicidade medem o potencial tóxico da substância que depende da concentração e quantidade que pode ser considerada tóxica, levemente tóxica e atóxica quando o percentual de inibição da germinação (% I) assume os seguintes valores: $\geq 40\%$; 10-40% e $\leq 10\%$ (TAMADA, 2009; LOPES *et al.*, 2010). A Figuras 31 mostra a evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade %I e %C no processo de biodegradação dos combustíveis dissolvidos em água ao longo do processo de biodegradação do B100 pela *P. aeruginosa*.

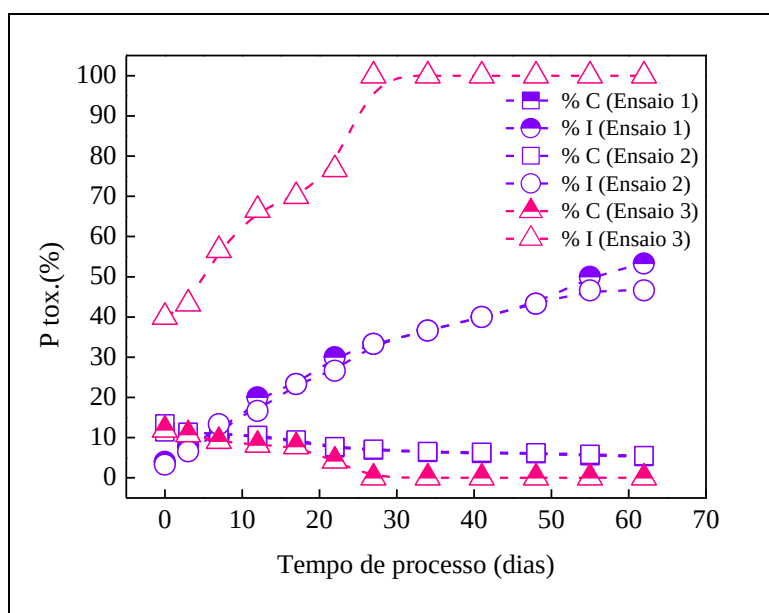


Figura 31- Evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade % I e % C na biodegradação dos combustíveis dissolvidos em água (5% v/v de B100/B20; $1,1 \times 10^{-2}$ g.cm⁻³ de LESS70; 30° C; 250 rpm; 0,5 v.v.m de ar).

Os resultados apresentados na Figura 31 mostram que inicialmente o meio contendo o B20 foi considerado levemente tóxico à semente de alface (%I $\leq 40\%$)

passando a torna-se tóxico a partir do 3º dia de processo, com redução do percentual de crescimento de suas raízes (10,8%) e a partir do 27º dia com de 100% de inibição à germinação das sementes.

As misturas com o diesel de petróleo apresentam hidrocarbonetos aromáticos, dentre os muitos componentes de hidrocarbonetos de petróleo e compostos monoaromáticos tais como benzeno, tolueno, etilbenzeno e os xilenos (BTEX) que são muito tóxicos quando liberados ao meio ambiente (CHAPELLE, 2001).

Por outro lado, o meio em presença do B100 sem nutriente (Ensaio 1) apresentou comportamento similar quanto àquele contendo o B100 com adição suplementar de KNO_3 (Ensaio 2) sendo considerado atóxico ($\%I \leq 10\%$) no início do processo. A partir do 7º dia ficou levemente tóxico ($10\% \leq I \leq 40\%$) e tóxico ($\%I \geq 40\%$) a partir do 48º dia de processo. Observou-se que o processo de biodegradação do B100 originou produtos menos tóxicos se comparado ao B20 provavelmente devido o B100 apresentar baixa complexidade estrutural. Vieira *et al.* (2006) em seus estudos também observou que o B100 se apresentava menos tóxico devido não conter nenhum composto orgânico volátil e nenhum hidrocarboneto aromático ou hidrocarbonetos clorados.

Na literatura, comumente se encontra relatos de que o processo de biodegradação é a chave na atenuação natural de contaminantes, porque reduz a massa dos contaminantes e, geralmente, transforma os contaminantes tóxicos em subprodutos não-tóxicos, minimizando os riscos à saúde pública e ao meio ambiente. No entanto, nesse trabalho foi observado elevação da toxicidade à semente de alface após processo de biodegradação dos combustíveis. Este fato também foi confirmado por Tamada *et al.* (2012 b) em estudo sobre a biodegradação de óleos vegetais e biodiesel em solo. Em estudo recente sobre a biodegradação do diesel e biodiesel Tamada (2013) confirma a toxicidade em tempos maiores de biodegradação do biodiesel no solo pelos organismos-teste *E. sativa* e *Cucumis sativus*. Para *Lactuca sativa* o diesel se mostrou menos tóxico principalmente nos tempos finais de biodegradação (120 e 150 dias) porém nos bioensaios com biodiesel de origem animal e biodiesel de origem vegetal a biodegradação aumentou a inibição de hipocótilo e raiz, evidenciados pela diferença significativa no crescimento em relação ao controle negativo. Isto mostra que o biodiesel ao ser biodegradado aumenta consideravelmente a toxicidade no solo devido a sua degradação, pois forma peróxidos e ácidos orgânicos de forma a reduzir o pH do solo, fato esse observado por Bouaid *et al.* (2007) no estudo com biodiesel de origem

vegetal. A diminuição do pH do solo inibe organismos superiores, como os organismos testes utilizados.

Segundo Tamada (2013) é observado alta toxicidade para os bioensaios com biodiesel de origem animal e de origem vegetal, sem diferença significativa para todos os bioensaios nos tempos finais de biodegradação (120 e 150 dias). O fato de não apresentar diferença significativa mostra que o conservante TBHQ não influencia de forma efetiva na toxicidade dos contaminantes.

Segundo Rosato (1997) os produtos parcialmente oxidados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o hidrocarboneto original, e portanto existe a preocupação de que ocorra um aumento temporário na toxicidade e mutagenicidade durante o processo de biodegradação.

Ao final do processo de biodegradação do biodiesel observou-se uma modificação nas características do meio, como uma mudança de coloração gradativa para marrom escuro e elevação da viscosidade. Este fato também foi evidenciado por Gomes (2008) após o 6º dia de biodegradação anaeróbia do biodiesel de soja e mamona em ambiente aquático. Melo (2004) também evidenciou a mudança de cor em biotratamento de borra oleosa em biorreator, com uma modificação do meio, para marrom escuro após o 5º dia de ensaio.

Uma das consequências da oxidação é o aumento da viscosidade do biodiesel, resultado de reações de condensação envolvendo as duplas ligações, e que leva a formação de gomas e sedimentos (KNOTHE, 2005).

4.6 Degradação do Biodiesel por Fotólise

A degradação abiótica pode ocorrer pela fotólise, oxido/redução, hidrólise e reações de troca iônica das substâncias químicas (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

A fotólise homogênea é um processo oxidativo com utilização direta da luz ultravioleta e vêm sendo muito empregada no tratamento de efluentes de indústrias para a degradação de contaminantes orgânicos (DANTAS, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2007).

Segundo Labuza (1971), o biodiesel é sensível à luz e está sujeito a degradação por foto-oxidação.

Nesse estudo a degradação por fotólise foi avaliada pela concentração dos principais EMAG C16:0 e C18:2 e pelo pH e parâmetros de toxicidade (%I e %C) do processo de degradação do biodiesel de algodão dissolvidos em água com 5% v/v e

$1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70. As Figuras 32 e 33 mostram os perfis de degradação por fotólise dos principais ésteres (C16:0) e (C18:2) presentes no biodiesel de algodão nas rotações de 750 rpm e 2000 rpm.

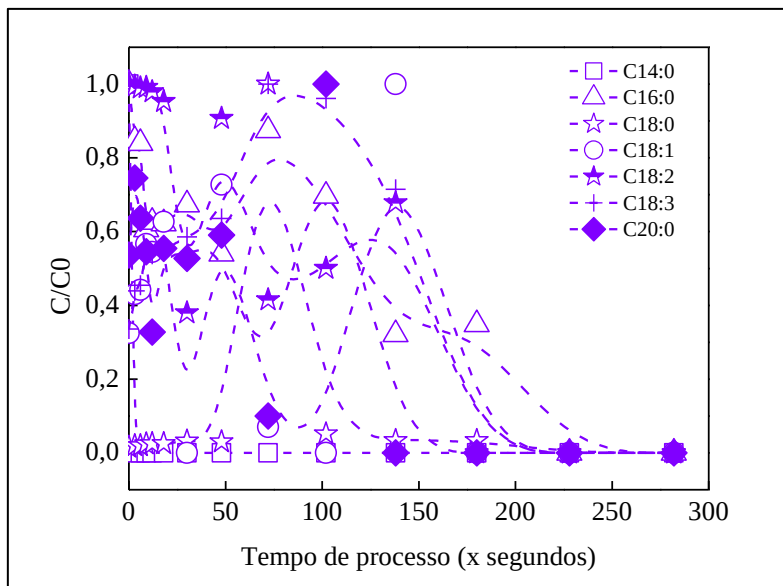


Figura 32- Perfil dinâmico do teor em massa normalizado dos principais EMAG presentes na mistura ao longo do processo de fotólise do B100 a 5% (v/v) a 750 rpm.

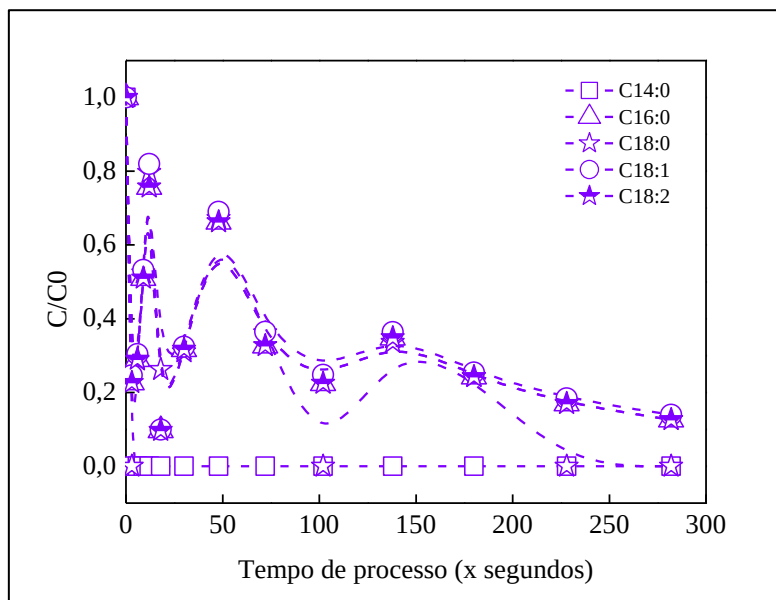


Figura 33- Perfil dinâmico do teor em massa normalizado dos principais EMAG presentes na mistura ao longo do processo de fotólise do B100 a 5% (v/v) a 2000 rpm.

A oxidação fotoquímica do biodiesel de algodão irradiado (254 nm) durante 28.200 segundos dos principais ésteres metílicos palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoléico (C18:2), resultou numa redução de 87,08% (C18:2), 86,04% (C18:1) e 86,08%

(C16:0), para rotação de 2000 rpm e de 100% de redução, para o ensaio à 750 rpm. Concluindo-se, portanto, que o aumento da agitação influenciou de forma negativa o processo oxidativo.

Segundo Vecchi *et al.*(2005), a oxidação fotoquímica do biodiesel de soja irradiado ($226,5 \text{ W/m}^2$) durante 100 horas sob ação da luz solar, apresentou redução da concentração inicial (50,68%) do éster etílico do ácido linoleico foi reduzida a 9,94%.

Os ésteres etílicos de ácido palmítico, oleico e esteárico apresentaram aumento da porcentagem relativa e formação de produtos (aldeído e cetona) após processo de degradação fotoquímica tendo sido favorecida pela sua composição quando submetida ao intemperismo e também ausência de aromáticos na sua constituição.

A Figura 34 mostra a evolução dinâmica do pH da fase líquida das misturas reagentes: B100 5% (v/v) durante o processo de degradação por fotólise nas rotações a 750 rpm e 2000 rpm.

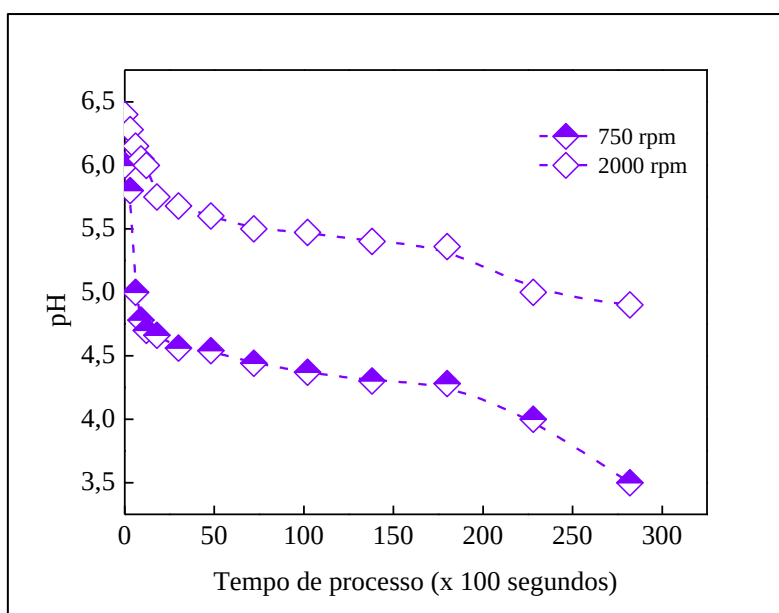


Figura 34- Evolução dinâmica do pH da fase líquida das misturas reagentes: B100 5% (v/v) a 750 rpm e 2000 rpm.

Observa-se que após o processo de degradação por foto-oxidação do biodiesel de algodão houve um aumento do percentual de acidez de (41,66%) e de (23,43%) para os processos nas velocidades de agitação a 750 e 2000 rpm, respectivamente.

Segundo a Resolução CONAMA 357/05, estes valores obtidos após tratamento por fotólise direta não se enquadram as condições de lançamento de efluentes que fixa o pH entre 5 a 9.

A Figura 35 mostra a evolução dinâmica da relação DQO/DBO₅ da fase líquida da mistura reagente para o processo de degradação por fotólise do B100 nas rotações de 750 rpm e 2000 rpm.

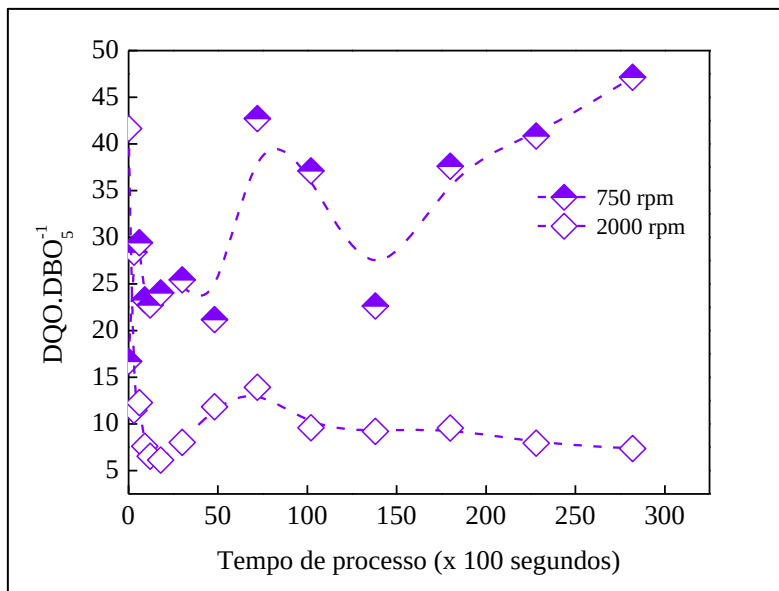


Figura 35- Evolução dinâmica do pH da fase líquida das misturas reagentes: B100 5% (v/v) a 750 rpm e 2000 rpm.

O resultado obtido para a relação DQO/DBO₅ mostra que houve 82,30% de remoção da matéria orgânica após o tratamento por fotólise direta à velocidade de agitação a 2000 rpm no entanto, este fato não foi observado à velocidade de agitação a 750 rpm.

A Figura 36 mostra a evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade %I e %C para o processo de degradação por fotólise do B100 nas velocidades de agitação a 750 rpm e 2000 rpm.

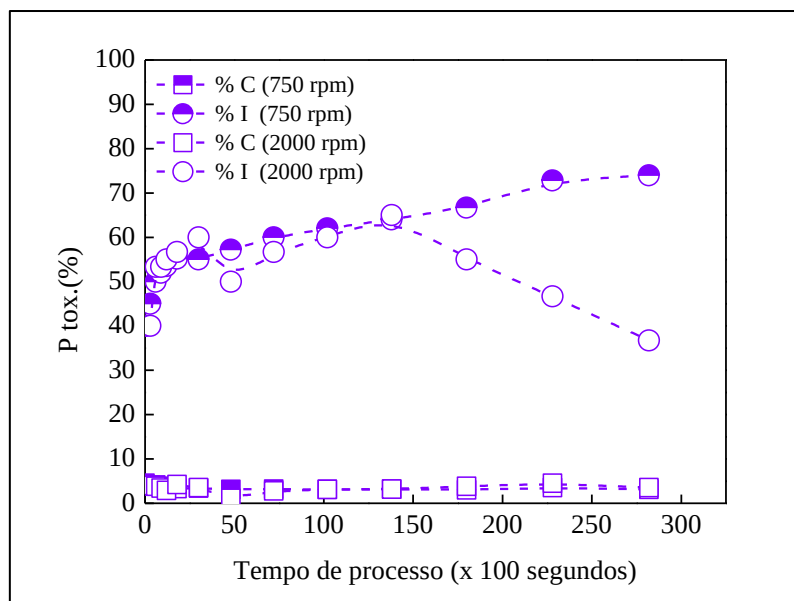


Figura 36- Evolução dinâmica do parâmetro de fitotoxicidade %I e % C na degradação do combustível dissolvido em água (5% v/v de B100; $1,1 \times 10^{-2}$ g.cm⁻³ de LESS70; 30° C).

Os resultados da fotólise mostram que após o tratamento sob a velocidade de agitação a 750 rpm houve aumento do %I em 37,5% para essa condição o meio apresentou aumento de acidez. Ao final do processo também se verificou uma modificação nas características do meio, como uma mudança de coloração gradativa para branco e elevação da viscosidade. No entanto, com aumento da agitação para 2000 rpm apresentou meio levemente tóxico cuja toxicidade à semente de alface foi reduzida em 8,25%.

Segundo Grangeiro (2014) em estudo de toxicidade utilizando sementes de alface, o resultado da avaliação da água da primeira lavagem, antes e após tratamento pelos métodos oxidativos avançados, mostrou o potencial tóxico destas amostras, visto que, após 5 dias de incubação não houve germinação de nenhuma semente. Este fato pode ser atribuído aos elevados valores de turbidez e óleos e graxas presentes nas amostras.

Para o efluente bruto (água da segunda lavagem do biodiesel de algodão) as sementes apresentaram uma inibição moderada crescendo aproximadamente 54,9%. Após o tratamento por exposição a UV foi observada uma toxicidade significativa reduzida no tratamento por fotólise com IG% de 95,3% o que confirma a importância da aplicação do tratamento, o que pode contribuir para evitar danos ao meio ambiente.

Autores em estudo sobre a avaliação da toxicidade de compostos orgânicos confirmam que o tratamento de efluentes por POA reduz a toxicidade das amostras.

No estudo de Pelegrini *et al.*(2009) houve redução de 80% da toxicidade de efluente contendo chorume tratado por processo de UVC/H₂O₂.

No entanto, se faz necessário estudar a aplicação de outros processos oxidativos avançados, objetivando a possibilidade de lançamento em corpos receptores dentro dos padrões estabelecidos pela Resolução CONAMA 430/11.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados dos estudos realizados nessa pesquisa sobre a fitotoxicidade e degradação do biodiesel de algodão, diesel e mistura B20 levam as seguintes conclusões:

a. Estudo da Fitotoxicidade em Água Destilada em Diferentes Valores de pH

- A acidez da água destilada afeta o processo de germinação das sementes de alface, pois os valores obtidos para o percentual de inibição (%I) descresem à medida que a acidez do meio aumenta.

b. Estudo da Fitotoxicidade da Água Destilada contendo LESS70 a diferentes valores de pH

- A presença do tensoativo LESS70 no meio provoca uma redução da inibição à germinação da semente de alface à medida que o meio aproxima-se da neutralidade.

c. Estudo do Efeito da Concentração do Combustível nas Águas Modelos

- O aumento da concentração volumétrica dos combustíveis faixa de 1-10% conferem-lhe características de um meio tóxico.
- A concentração letal (CL₅₀) para o biodiesel de algodão é igual a 3%.

d. Estudo do Efeito do pH nas Águas Modelos

- O aumento da acidez confere às sementes de alface características de um meio tóxico que se comporta da seguinte forma: diesel > Mistura B20 > biodiesel (B100).

e. Avaliação Preliminar da Biodegradação dos Combustíveis em Balões de fundo chato

- O biodiesel de algodão, o diesel e sua Mistura B20 sofreram biodegradação parcial quando usados como biomassa a *Saccharomyces cerevisiae* e *Pseudomonas aeruginosa* não adaptados e adaptados.
- A eficiência do processo de biodegradação dos combustíveis se comporta da seguinte forma: biodiesel (B100) > Mistura B20 > diesel, o que já era previsto devido a composição dessas misturas de compostos orgânicos.
- As populações de células viáveis observadas no processo decaem (10^7 UFC.cm^{-3} para 10^5 UFC.cm^{-3}) indicando uma cinética de morte de primeira ordem.
- A *Pseudomonas aeruginosa* tem maior potencial de degradação dos combustíveis do que a *S. cerevisiae*.
- A cultura de *Pseudomonas aeruginosa* adaptada é mais eficiente que a cultura não adaptada, com um potencial de remoção da matéria orgânica de cerca de 61%.
- Durante a biodegradação dos combustíveis há redução do pH devido a formação de produtos metabólicos ácidos. Estes componentes apresentaram um grau de toxicidade à semente de alface mais elevado para levedura comparada à bactéria.

d. Estudo da Biodegradação do biodiesel e Mistura B20 em Reator Tipo Tanque

- As cinéticas de biodegradação dos combustíveis apresentaram a seguinte ordem: B100 (Ensaio 2) > B100 (Ensaio 1) > Mistura B20 (Ensaio 3).
- O processo de biodegradação do biodiesel de algodão apresentou diminuição da concentração dos principais ésteres metílicos de ácidos palmítico (C16:0) e linoléico (C18:2) com perfil cinético de decaimento de reação de primeira ordem.
- A cinética no Ensaio 2 foi mais rápida para o éster linoléico (C18:2), comparada ao éster palmítico (C16:0).

- Houve redução do pH nos sistemas de biodegradação, estes resultados estão em não conformidade aos valores recomendados pela Resolução CONAMA 357/05, que fixa o pH entre 5 a 9 para condições de lançamento de efluentes.
- Durante a biodegradação ocorreu redução nas populações de células viáveis com decaimento de 10^7 UFC.cm⁻³ para 10^4 UFC.cm⁻³ indicando uma cinética de morte de primeira ordem.

e. Estudo da Degradação do biodiesel por Fotólise direta

- Ocorreu redução parcial dos principais metílicos palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoléico (C18:2) para rotação de 2000 rpm e 100% para o ensaio à 750 rpm. Concluindo-se portanto, que o aumento da agitação influenciou de forma negativa o processo oxidativo.
- Aumento do percentual de acidez de (41,66%) e de (23,43%) após o tratamento do biodiesel por fotólise direta as rotações de 750 e 2000 rpm, respectivamente.
- Remoção de 82,30% da matéria orgânica após tratamento por fotólise direta à velocidade de agitação à 2000 rpm.
- Após tratamento do biodiesel por fotólise redução da toxicidade à semente de alfaca à velocidade de agitação 2000 rpm. Aumento do % I as sementes a agitação de 750 rpm.

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. Z. M. A biorremediação como ferramenta para a minimização de problemas ambientais. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2003.
- ABOSSAI. Óleos vegetais. Disponível em: <http://abossai.com.br/sebo/>. Acesso em: outubro 2015.
- ADAM,G.; DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. Disponível em: <http://eprints.gla.ac.uk/430/1/Adam%20%20Duncan%20.2002.pdf>.
- ALEXANDER,M. Biodegradation and Bioremediation academic Press, 2ed. 1994.
- ALLINGER, N.; CAVA, M.; DEJONGH, D.; JOHNSON, K.; LEBEL, N.;STEVEN,C. Trad. de R.B. de Alencastro, J.S. Peixoto e L.R.N. de Pinho. Química orgânica. Rio de Janeiro, 1985.
- ALMEIDA, D. G. de. Degradação de “bunker” mf-380 por micro-organismos consorciados da região portuária de SUAPE – PE. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Biotecnologia Industrial. Recife,2013.
- ALOUI, F.; KCHAOU, S.; SAYADI, S. (2009) Physicochemical treatments of anionic surfactants wastewater: effect on aerobic biodegradability. Journal of Hazardous Materials, n. 164, p. 353-359.
- AMARAL, D. F.Desmistificando o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel – A Visão da Indústria Brasileira de Óleos Vegetais. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais - ABIOVE, São Paulo, Agosto, 2009, 21p.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás e Biocombustíveis. Resolução ANP N°7. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: jan.2014.
- ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. Cap. 6, p: 117 – 152. 2006.
- ARAUJO L. V.; FREIRE D. M. G. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. Química Nova, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.
- ASSUNÇÃO,L.P.G.;ROHLFS,D.B.Biorremediação em áreas contaminadas. <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/7mostra/Artigos/SAUDE%20E%20BIOLOGICAS/BIORREMEDIA%C3%87%C3%83O%20EM%20C3%81REAS%20CONTAMINADAS.pdf>. 2012.
- ATLAS,R. M. Petroleum Microbiology. New York. Macmillan Publishing Company, 1984.
- ATLAS,R.M. Bioremediation of Petroleum Pollutants.International Biodeterioration & Biodegradation. p.317-327.1995 a.

ATLAS,R.M. Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. Marine Pollution Bulletin.p.178-182. 1995c.

ATLAS, R. M. Applicability of bioremediation to eastern European pollution problems. In: TRAINING WORKSHOP OF ICS-UNIDO ON "SOIL ENVIRONMENTAL ASSESMENT AND BIOREMEDIATION TECHNOLOGIES", 1997.

AZADPOUR-KEELEY, A., RUSSELL, H. H., SEWELL, G.W. Microbial Processes Affecting Monitored Natural Attenuation of Contaminants in the Subsurface. EPA-Ground Water Issue,18.1999.

BAKER,K. H.;S. HERSON.Bioremediation.New York. McGraw-Hill,inc. 375p. 1994.

BAPTISTA, S.J. *et al.* Avaliação da bioestimulação em solos argilosos contaminados com petróleo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO & GÁS,2., Rio de Janeiro, 2013.

BARTHA,R.Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. Microbial Ecology. 155-172,1996.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed). Biofuel production-recent developments and prospects. Rijeka: InTech, 2011. Cap. 5, p. 85-100

BEDIENT, P. B; NEWELL, C. J.; RIFAI, H. S. Ground water contamination: transport and remediation. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1997. 604 p.

BEEK,B.;BOHLING,S.;FRANCE,C.;JOHNCKE,U.;STUDINGER,G.;THUMM,E.The assessment of biodegradation and persistence. In: Beek,B. (ed.).Biodegradation and persistence, the handbook of environmental chemistry, Reaction and processes, part K, Springer-Verlag. Berlim,2001.

BENINCASA,M.;CONTIERO,J.;MANRESA,M.A.;MORAES,I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source. Journal of Food Engineering, Essex,v.54,p.283-288,2002.

BENTO,F.M.,CAMARGO,F.A.O.,OKEKE,B. Biorremediation of soil contaminated by diesel oil. Brazilian Journal of Microbiology, 65-68,2003.

BELTRÃO, N. E. de M., Breve História do Algodão no Nordeste do Brasil. EMBRAPA, Paraíba, dez. 2003.

BHUPATHIRAJU,V.K. *et al.* Assessment of in-situ bioremediation at a refinery waste-contaminated site and an aviation gasoline contaminated site. Biodegradation,79-90,2002.

BIRCHALL,C.;NEWMAN,J.;GREAVES,M.Degradation and phytotoxicity of biodiesel oil. London: Institute of Arable Crops Research-Centre for Aquatic Plant Management,1995.27p.

BORDEN,R.C.;GOMEZ,C.A.;BECKER,M.T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. Ground Water, 180-189, 1995.

BRETANO, D.M. Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário. 2006. 104p. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, SC.

BÜCKER,F. Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Porto Alegre, 2009.

BURATINI, S. V & BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: P. A. Zagatto & E. Bertoletti (eds.). Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. RiMa Editora, São Carlos, SP, p. 55-88.2006.

CARDOSO, E.J.B.N. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. eds. Microbiologia do Solo. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 33-39,1992.

CAVALCANTI, L.A.P. Reologia de Biodiesel de Origens Diversas e das Misturas Diesel/Biodiesel. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Engenharia Química. Recife, 2008.

CETESB:COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Decisão de Diretoria nº 103/2007/C/E, de 22 de junho de 2007, 2007a. 40p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 10 mar. 2015.

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

CHAPMAN, P.M.; HO,T.K.; MUNNS Jr, W.R. SOLOMON, K.; WEINSTEIN, M.P. Issues in Sediment Toxicity and Ecological Risk Assessment. Marine Pollution Bulletin.v. 44, p.271-278, 2002.

CHEON, J. Y., LEE, J. Y., LEE, K. K.Characterization of the hydrogeologic environment at a petroleum hydrocarbon contaminated site in Korea. Environmental Geology, 869-883, 2004.

CLAUSS,J. Interesterificação de óleo de palma. Óleos Grãos, São Paulo, 31-37,1996.

CORDAZZO, J. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2000.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. Wat. Sci. Tech.,311-318, 1996.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. Contaminação de água subterrânea por derramamento de gasolina: O problema é grave? Engenharia Sanitária, 50-54, 1998.

COSTA,A.H.R.; NUNES,C.C.;CORSEUIL, H.X. Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com o uso de nitrato. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 14, n. 2, p. 265-274.2009.

COSTA, C.H. Estudo ecotoxicológico para valorização do resíduo produzido no processo de polimento de piso porcelanato na indústria cerâmica. 2010. 153f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, 2010.

CRAPEZ,M.A.C.;BORGES,A.L.N.;BISPO, M.G.S. & PEREIRA, D.C. 2002. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. Ciência hoje, 30: 179.

CRUZ, J. M. Avaliação ecotoxicológica da biodegradação utilizando inóculo enriquecido com *Bacillus subtilis* em solo contaminado com petróleo, diesel e biodiesel.Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2013.

CRUZ, J.M. *et al.*. Phytotoxicity of soil contaminated with petroleum derivatives and biodiesel. Ecotoxicology and Environmental Contamination, v. 8, n. 1, p.49-54, 2013.

CRUZ,J.M. *et al.* Toxicity assessment of contaminated soil using seeds as bioindicators. Journal of Applied Biotechnology, v.1, p.1-10, 2013.

DALL´AGNOL. Algodão – alternativa atual. Revista Biodieselbr. São Paulo, mar. 2010.

DANTAS, R. F. *et al.* Direct UV photolysis of propranolol and metronidazole in aqueous solution. Chemical Engineering Journal 158 (2010) 143–147.

DELILLE,D.;BASSERES,A.;DESSOMMES,A.;ROSIERS,C. Influence of daylight on potencial biodegradation of diesel an crude oil in antartic seawater. Marine Environmental Research,v.45,n.3,p.249-258.

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: 894-904, 2007.

DEMIRBAS,A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. Energy Convers. Manage, v. 49, p. 2106–2116, 2008.

DEON, M.C. *et al.* Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 33, n. 1, p. 73-82, 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, 18, p.416-423.2007.

DUNN, R. O.; J. AM. Oil Chem. Soc. 2002, 79, 915.

EBERLEIN, C. V. Germination of Sorghum alnum seeds and longevity in soil. Weed Science, v. 35, n. 6, p. 796-801, 1987.

ENGLERT, C. J.; KENZIE, E. J. Bioremediation of Petroleum Products in Soil. API, v. 40, p. 111-129. 1993.

ENVIRONMENT CANADA. Biological test method: test of reproduction and survival using the cladoceran Ceriodaphnia dubia. EPS – Report EPS 1/RM/21. 72p.1992.

EPA. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA 712-C-96-154. april 1996.

European Comission, (CE) Technical guidance document on risk assessment in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, European Chemicals Bureau, Institute for health and consumer protection, 2003.

FENG, Y. C.; JEONG-HUNPARK, R.; VOICE, T. C.; BOYD, S. Bioavailability of Soil- Sorbed Biphenyl to Bacteria. Environmental Science and Technology, v.34, p.1977- 1984, 2000.

FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, P.; VILA, J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.M.; GRIFOLL, M.; LEMA, J.M. Trials of bioremediation on a beach affected by the heavy oil spill of the Prestige. *J.H.M.*, 1523-1531, 2006.

FERRARI, A. R.; SOUZA, W. L. de.; Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. Química Nova, Vol. 32, No. 1, 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. Quím. Nova, 19-23, 2005.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Campinas, v.12, p.175-204, 2000.

FINCH, G.L.; HOBBS, C.H.; BLAIR, L.F.; BARR, E.B.; HAHN, F.F.; JARAMILLO, R.J.; KUBATKO, J.E.; MARCH, T.H.; WHITE, R.K.; KRONE, J.R.; ME´NACHE, M.G.; NIKULA, K.J.; MAUDERLY, J.L.; VAN GERPEN, J.; MERCEICA, M.D.; ZIELINSKA, B.; STANKOWSKI, L.; BURLING, K.; HOWELL, S. Effects of subchronic inhalation exposure of rats to emissions from a diesel engine burning soybean oil-derived biodiesel fuel. Inhalation Toxicology Journal, v. 14, p.1017–1048, 2002.

FLOHR,L. *et al.* Classificação de resíduos sólidos industriais com base em testes ecotoxicológicos utilizando *Daphnia magna*: uma alternativa. Biotemas, Florianópolis, v. 18, n. 2, p. 7-18, 2005.

FLOODGATE,G.D. The fate of petroleum in marine ecosystems. In: Petroleum Microbiology. Macmillan, New York, 355-398,1984.

FOLLIS,P.A.An investigation into the biodegradability of soy diesel under various environmental condicions.M.S.Thesis. Duquesne University, Pittsburg, Pennsylvania,1994.

GARCIA, J. C. Degradação fotocatalítica artificial e solar de efluentes têxteis por processos oxidativos avançados utilizando TiO₂. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá. Paraná.2006.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO G. P.; Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 34, 36, 2005.

GIORDANO G., Tecnologias de tratamento e controle de efluentes industriais. Curso de Especialização em Saneamento Ambiental. Modulo II: Efluentes Industriais. UFTM, Cuiabá. 2004.

GOGOU, A.; BOULOUBASSI, I.; STEPHANOU, E.G. Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1. Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea surficial sediments. Marine Chemistry, v. 68, p. 265 – 282, 2000.

GOMES, A.P.N. Biodegradação de Biodiesel de Soja, Mamona e Hidrocarbonetos Monoaromáticos em Ambientes Aquáticos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Recife, 2008.

GOMES, E. B. 2004. Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo terminal portuário de SUAPE-PE. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

GRANGEIRO, R. V. T. Caracterização da água de lavagem proveniente da purificação do biodiesel. 40f. Dissertação (Mestrado) –Centro de ciências exatas e da natureza, Universidade Federal da Paraíba – Paraíba, 2009.

GRANGEIRO, R. V. T. Avaliação dos tratamentos oxidativos avançados em água de lavagem de biodiesel e ensaios de fitotoxicidade. Tese (Doutorado) –Centro de ciências exatas e da natureza, Universidade Federal da Paraíba – Paraíba, 2014.

HAMME,V.;SINGH,A.;WARD,O.P. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Mol Biol Rev. Dec; 67(4):503-49,2003.

JACQUES, R. J.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Ciência Rural. 2007, v.37, n.4, p. 1192-1201.

JARDIM, WILSON F.; CANELA, MARIA CRISTINA. 2004. Fundamentos da Oxidação Química No Tratamento de Efluentes e Remediação de Solos. UNICAMP. Campinas.

JUVONEN, R.; MARTIKAINEN, E.; JOUTTI, A.; AHTIAINEN, J.; LEHTOKARIS, M.: A Battery of Toxicity Tests as Indicators of Decontamination in Composting oils Waste. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 47, p. 156-166. 1999.

KAO, C. M. ; WANG, C. C. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. *Wat. Res.* 3413-3423, 2000.

KARAMALIDIS, A. K.; EVANGELOU A. C.; KARABIKA E.; KOUKKOU, A. I.; DRAINAS, C.; VOUDRIAS, E. A. Laboratory scale bioremediation of petroleum contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. *Bioresource Technol*, v. 101, p. 6545-6552, 2010.

KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação do resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “Landfarming”. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, 2001.

KENNISH, M.J. Pollution impacts on marine biotic communities. CRC Press LLC, Boca Raton, FL., 1997.

KHAN, N.; WARITH, M. A.; LUK, G. A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms. *J.A.W.M.A.*, 2004.

KILBANE II, J. J.; RANGANATHAN, R.; CLEVELAND, L.; KAYSER, J. K.; RIBEIRO, C.; LINHARES, M.: Selective Removal of Nitrogen From Quinoline and petroleum by *Pseudomonas ayucida* IGTN9m. *Applied and Environmental Microbiology*. v.66 n.2. 2000.

KLAASSEN, C. D. 2001. Casarett and Doull's Toxicology – The basic science of poisons. 6th ed., New York: MacGraw-Hill.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process. Technol.* 86 (10). 1059-1070. 2005.

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

KOCH, A.K.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal of Bacteriology*, Washington v.173, p.4212-4219, 1991.

KOMATSU, T.; HANAKI, K.; MATSUO, T. *Water Sci. Technol.*, 1189, 1991

KOWALICK, W.W.; JR. Removing Impediments to the use of Bioremediation and Other Innovative Technologies in: Environmental Biotechnology for waste Treatment. New York. G.S. Sayler, R. Fox, and J.W. Blackburns editors. Plenum Press, p.53-60. 1991.

LABUZA, T. F.; Kinetics of lipid oxidation in foods. *Crit. Rev. Foods Tech.* 1971, 2, 355.

LANDIS WG, YU MH. Introduction to environmental toxicology: impacts of chemical upon ecological systems. Florida: Lewis Publishers. 1995.

LAWNICZAK,L.;MARECIK,R.;CHRZANOWSK,L.Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013,97,2327-2339.

LEAHY, J.G., COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hidrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews* 305-315,1990.

LEHNINGER,A.L.Bioquimica.Edgard Blucher,São Paulo, 1997.

LEUNG, D. Y. C., KOO, B. C. P., GUO, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. *Bioresource Technol.*, 250-256, 2005.

LI,G.F.,HUANG,W.,LEARNER,D.N.,HANG, X. Enrichment of degradation microbes and bioremediation of Petrochemical contaminants in polluted soil.Pergamon,3845-3853,2000.

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

LIANG, M.H.; JIANG, J.G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Prog Lipid Res*, v. 52, p. 395-408, 2013.

LIMA,J.R.;NASSU,R.T. Química Nova,127.1996.

LIU,S.;SULFITA, M. Anaerobic biodegradation of methyl esters by *Acetobacterium woodii* and *Eubacterioum limosum*. *J. Industrial. Microbiol.* 321-327, 1994.

LOPES, P.R.M.; MONTAGNOLLI, R.N.; DOMINGUES, R.F.; BIDOIA, E.D. Toxicity and biodegradation in sandy Soil contaminated by lubricant oils. *B. Environ. Contam. Tox.* 2010; 84: 454–458.

MA F.;HANNA,M.A. Biodiesel production. *Bioresource Technology* (1999), 70:1-15.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M.E.A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. *R. Árvore*, v.30, n.4, p.547-555, 2006.

MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. Rio Claro, SP. Tese (Doutorado) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2006.

MARIANO, A.P.; KATAOKA,A.P.A.G.; ANGELIS, D.F.; BONOTTO, D.M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Braz. J. Microbiol.* 2007; 38(2): 346-353.

MARIANO, A. P.; TOMASELLA, R. C.; OLIVEIRA, L.M.; CONTIERO, J.; ANGELIS, D. F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechnology*, 1323-1328, 2008.

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

MONTAGNOLLI, R. N. Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. 2011: 245 p. Dissertação (mestrado em microbiologia aplicada) – Universidade estadual paulista, Rio Claro, 2011.

MORAIS, J.L.; ZAMORA, P.P. (2005) Use of advanced oxidation processes to improve the biodegradability of mature landfill leachates. *Journal of Hazardous Materials B*, n. 123, p. 181-186.

MORAES, B. E.; TORNISIELO, T. M. S. Biodegradation of oil refinery residues using mixed- culture of microorganisms isolated from a landfarming. *Braz Arch Biol Techn*, v. 52, p. 1571-1578, 2009.

MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora UFLA, 626, 2002.

MORETTO, E.; FETT, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais. Rio de Janeiro: Varela, 1989.

MORRISON, R., BOYD, R. Química Orgânica. Trad. de M.A. da Silva e A.J. de Gouveia. Lisboa: Fundação C. Gulbenkian, 1992.

MOSER, B.R. Biodiesel production, properties, and feedstocks. In *Biofuels*. Springer, New York, pp.285-347. 2011.

MOSER, B.R. Comparative oxidative stability of fatty acid alkyl esters by accelerated methods. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 699-706, 2009.

MOURA, A. SAMARA, F. O que são hidrocarbonetos. Disponível em: [http://www. Bi remediação\hidrocarbonetos\2 Rosas O que são os Hidrocarbonetos.htm](http://www.Bioremédiação\hidrocarbonetos\2 Rosas O que são os Hidrocarbonetos.htm)>. Acesso em: mar. 2006.

MROZIK, AGNIESZKA; PIOTROWSKA-SEGET, ZOFIA. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research* v.165 p. 363-375, 2010.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 14, n. 5, p. 372-378, 2009.

MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W H.: Bioquímica .9º edição .Atheneu Editora. São Paulo, 2002.

MURUGESAN, A.C.; UMARANI, T.R.; CHINNUSAMY, M.; KRISHNAN and R. SUBRAMANIAN *et al.*, 2009. Production and analysis of bio-diesel from non-edible oils-A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 13: 825-834. DOI: 10.1016/j.rser.2008.02.003.

NASCIMENTO, I.A. *et al.* Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. *Ecologia Aquática: Princípios e Aplicações*, São Carlos-SP, p.413-429, 2008.

NASSIF, S.M.L.; VIEIRA, I.G.; FERNADES, G.D. Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação de sementes. Piracicaba: IPEF/LCF/ESALQ/USP, Informativo Sementes IPEF, 1998.

NIEMAN, C., *Bact. Rev.*, 147, 1954.

NOVAK, J. T.; CARLSON, D.; *J. Water Pollut. Control Fed.* 1970, 42, 1932.

OECD. Terrestrial plants: Growth test. OECD Guidelines for testing of chemicals, Paris: N°. 208, 1984.

OGBO, E. M. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology* v. 8, n°2, p. 250-253, 2009.

OLSON, J. J. *et al.* Biodegradation rates of separated diesel components. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999.

OWSIANIAK, M.; CHRZANOWSKI, L.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; HEIPIEPER, H. J. "Biodegradation of diesel/biodiesel blends by consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants". *Bioresource Technology*, 1497-1500, 2009.

PAGGA, U. Testing Biodegradability with Standardized Methods. *Chemosphere*, 2953-2972, 1997.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. ; MITCHELL, D. New development in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 1153-1169, 2000.

PASQUALINO, J. C.; MONTANE, D.; SALVADO, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass and Bioenergy*, v.30, p.874-879, 2006.

PELCZAR, M.J., CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2. Ed. Pearson Makron Books. São Paulo, 1997.

PELEGRINI, R.T.; BRITO-PELEGRINI, N.N. de; PATERNIANI, J.E.S.; BROTA, G.A.; SANTOS, E.M.; SILVA, N.B., Ensaios biológicos com sementes para avaliar a redução da toxicidade do chorume tratado por processo fotoquímico. 2009.

PEREIRA, M. G., MUDGE, S. M. Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels, *Chemosphere*, 297-304, 2004.

PEREIRA, L. T. C.; LEMOS, J. L. S. Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus niger* e *Penicillium corylophilum*. Disponível em: <<http://scielo.com.br>>. Acesso em: Outub.2015.

PIMENTEL, M.F. *et al.* O uso de *Artemia sp.* como organismo-teste para avaliação da toxicidade das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator biológico experimental. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 6, n. 1, p. 15-22, 2011.

POON, R.; CHU, I.; VALLI, V.E.; GRAHAM, L.; YAGMINAS A.; HOLLEBONE, B.; RIDEOUT, G.; FINGAS, M. Effects of three biodiesels and a low sulfur diesel in male rats – A pilot 4-week oral study. Food and Chemical Toxicology, v. 45, p. 1830 – 1837, 2007.

PRINCE, R.C.; HAITMANEK, C.; LEE, C.C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. Chemosphere. n.71, p.1446-1451. 2008.

QUEIROZ, S., RIBEIRO, S. Algodão biológico. Disponível em: <<http://efablogverde.blogspot.com>>. Acesso em: mar.2015.

RAIMUNDO, R. S.; RIZZO, A. C. L. Utilização de biorreatores no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. X Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT. 2002.

RAMOS, L. P. Aspectos técnicos sobre o processo de produção de biodiesel. In: SEMINÁRIO PARANAENSE DE BIODIESEL, 1., 2003, Londrina.

RAND, G. M. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment. 2nd ed., Washington: Taylor e Francis, 2000.

RESCHKE, K.S.S. Estudos microbiológicos para tratamento de água subterrânea de áreas contaminadas por hidrocarbonetos. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2012.

RESTANI, G. C. Efeitos de cepas tóxicas e não tóxicas de *Cilindrospermopsis raciborskii* sobre aspectos do ciclo de vida de *Daphnia laevis* (Cladocera, Daphnidae). Itajuba, 2011. 67 p. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Universidade Federal de Itajubá.

RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. International Biodeterioration & Biodegradation, London, v.44, n.2-3, p.93-100, 1999.

RINZEMA, A., BOONE, M., VAN KNIPPENBERG, K., LETTINGA, G. *Water Environ.Res.* 1994.

RIZZO, L.. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. Water Reserch, n. 45, p.4311-4340, 2011.

ROBLES,A.;LUCAS,R.;CIENFUEGOS,G.A.de;GÁLVEZ,A. Biomass production and detoxification of wastewater from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. *Bioresource Technology*, 217-221,2000.

ROCHA, M.F.A. Biodegradação de biodiesel de algodão em ambiente aquático. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Engenharia Química. Recife, 2011.

RODRIGUES,R.V.;MIRANDA-FILHO,K.C.; GUSMÃO,E.P.; MOREIRA,C.B.; ROMANO,L.A.; SAMPAIO,L.A.; Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum,diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae.Sci. Total Envir. 408,2054-2059.2010.

ROMERO, P.R; CANTÚ, A.M. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas em agua y suelo. La experiencia en Mexico. In:_. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas em água y solo. 1 ed, México: Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Naturais, 2008, p. 428.

ROSATO, Y.B. Biodegradação do petróleo In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Org) Microbiologia ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA, 307-334,1997.

ROGERS, M.I.; MCCONKEY G.A., LI, I, MCCUTCHAN, T.F. The ribosomal DNA loci in *Plasmodium falkiparum* accumulate mutations independently. *J Mol Biol* 254:881-891. 1995.

RÖLING, W. F. M.; VERSEVEL, H. W. Natural attenuation: What does the subsurface have in store? *Biodegradation*, 53–64, 2002.

SANTOS, R. M; RIZZO, A. C. L; SOBRAL, L. G.S. Remediação de solo contaminado por petróleo em biopilhas – escala piloto. Campinas: Centro de tecnologia mineral CETEM, 2007.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of bio solids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, v. 136, p.187–195, 2005.

SAWYER, C. N.; Mc CARTY, P. L.; PARKIN, G. F. Chemistry for Environmental Engeneering, 4th Edition, 658, 1994.

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

SHARMA, Y.C.; SINGH, B. Development of biodiesel: current scenario. *Renew. Sustain. Energy Rev.*13 (6).1646-1651.2009.

SILVA, D.S.P. Degradação de óleo diesel por consórcio microbiano misto isolado de ambiente poluído. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Biológicas Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2012.

SILVA, E. de P.; SILVA, H. M. G.; ALMEIDA, R. de S.; MONTEIRO, E. A.; ROCHA, T. M. Determinação do índice de acidez em óleo de milho para produção de biodiesel.

Disponível em:
<http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/viewFile/1810/1069>. Acesso em: jan.2015.

SILVA, R. L. B. *et al.* Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. Caderno Saúde Pública, 1599-1607, 2002.

SIMONATO, J.D.; GUEDES, C.L.B.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. Ecotox. Environ. Safe. 69, 112-120. 2008.

SINGER, M.E.; FINNERTY, W.R. Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In: Petroleum Microbiology, Atlas, R.M. (eds). Macmillan Publishing, New York, 1-60, 1984.

SIQUEIRA, J. O., MOREIRA, F. M. S., GRISI, B. M., HUNGRIA, M. , ARAÚJO, R. S. Microrganismos e Processos Biológicos do Solo: Perspectiva Ambiental. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 142, 1994.

SOBRERO, M.C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L). In: In: MORALES, G.C. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA: México. 2004, 142p.

SOLANO-SERENA F, MARCHAL R, CASARÉOLA S, VASNIER C, LEBEAULT JM, VANDECASTEELE JP. A *Mycobacterium* strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. Appl Environ Microbiol. 2000;66:2392–2399. doi: 10.1128/AEM.66.6.2392-2399.2000.

SORKHOH, N.A.; IBRAHIM, A.S.; GHANNOUM, M.A. ; RADWAN, S.S. High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwait desert. Applied Environmental Microbiology, 123-126, 1993.

SOUZA, E.C.; VESSONI-PENNA, T.C.; SOUZA OLIVEIRA, R.P. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. Int. Biodeterior. Biodegrad. v. 89, p. 88-94, 2014.

STINE, K.; BROWN, T.M. Principles of Toxicology. Boca Raton: CRC Press; 1996.

STRONG, C.; ERICKSON, C.; SHUKLA, D. Evaluation of biodiesel fuel. Literature Review (Nº FHWA/MT-04-001/8117 -8120). Montana Department of Transportation Research Section. 2004.

TAMADA, I.S. Avaliação toxicológica durante a biodegradação de óleos e biodiesel. Trabalho de conclusão de curso (ecologia). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2009.

TAMADA, I.S. Biodegradação e avaliação fitotoxicológica do diesel e biodiesel. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências de Rio Claro. Rio Claro, 2013.

TANVEER, A. *et al.* Influence of seed size ecological factors on the germination and emergence of field bindweed *Convolvulus arvensis*. Planta daninha, Viçosa-MG, v.31, n.1, p. 39-51, 2013.

TEIXEIRA, A. S.; BENTO, F. M. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial. 2007. Dissertação (Mestrado em faculdade de Agronomia) - Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2007.

THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.;DELVESBROUGHTON, J. Nisin. In: NAIDU, A.S. Natural Food Antimicrobial Systems. New York: CRC Press, p. 463-524, 2000.

TIQUIA, S. M.; N. F. & HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*; 93 (3): 249-256, 1996.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 8.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 894p.

URURAHY, A. F. P.; MARINS, M.D.M.; VITAL, R. L.; GABARDO, I. T.; PEREIRA Jr., N.: Effect of Aeration Biodegradation of Petroleum Waste. Rev. Microbiol. V.29 n.4. p. São Paulo, 1998.

U.S. Environmental Protection Agency- USEPA. Ecological Effects Test Guidelines: Seed Germination/Root Enongation Toxicity Test.1996.

VALLEJO, V.; SALGADO, L.; ROLDAN, F. Evaluacion de la bioestimulacion em la biodegradacion de TPHs em suelos contaminados com petróleo. Bioestimulation process during the biodegradation of THH in oil contaminated soil. Rev. colomb. Biotecnol. v.8, p.67-78. 2005.

VARSHO, B.J. Acute oral toxicity study of 100% REE in albino rats. WIL Research Laboratories, Inc. Ashland, OH, USA. Final Report (WIL-275003),1996a.

VAUHKONEN, V.; LAUHANEN,V. SUOJARANTA, S. The phytotoxic effects and biodegradability of stores rapeseed oil and rapeseed oil methyl ester. Agric. Food Sci.20 (2),131-142.2008.

VECCHI,C.C.C. ;TAROZO,R.;PINTO,J.P.;FACCIONE,M.; GUEDES,C.L.B.Processo térmico e fotoquímico na degradação de biodiesel do óleo de soja. 3º Congresso Brasileiro de P & D em Petróleo e Gás. 2005.

VICENTE,G.;MARTINEZ,M.;ARACIL,J.Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems, Biores. Technol.,297,2004.

VIDELA, H. A., "Biocorrosion of nonferrous metal surfaces", em: Biofouling an Biocorrosion in Industrial Water Systems, G. G. Geesey, Z. Lewandowski, H. C. Flemming (eds.), p. 231, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, (1994)

VIEIRA, T. M.; SILVA, E. P.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; 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. Artigos técnico-científico, Brasília, v. 1, p. 218-223, 2006.

VIEIRA, THAÍS MAITAN; LIMA, MARIANA FERREIRA DE PEIXOTO, R.M. E VIEIRA, JOSÉ DANIEL GONÇALVES. Utilização de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) em Teste Rápido de Caracterização de Potenciais Biodegradadores de Biodiesel. Disponível em: <www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/armazenamento/1.pdf>. Acesso em maio 2016.

VON WEDEL, R.; POINT RICHMOND, C.A. Marine biodiesel National Renewable Research Lab.1999.

VROBLESKY, D. A.; CHAPELLE, F. H. Temporal and spatial changes of terminal electronaccepting processes in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer and the significance for contaminant biotransformation. *Water Resource Res.*,1561-1570, 1994.

WALT, W.; McNAB Jr. Comparisons of geochemical signatures of biotransformation of fuel hydrocarbons in groundwater. *Environmental Monitoring and Assessment*, 257–274, 1999.

WALTER,M.V. Bioaugmentation. In: *Manual of Environmental Microbiology*. Washington. American Society for Microbiology –ASM.p.753-57.1997.

WALWORTH, J.L.; WOOLARD, C.R.; BRADDOCK, J.F.; REYNOLDS,C.M. The Role of Soil Nitrogen Concentration in Bioremediation. Fourth International *in situ* and On-site Bioremediation Symposium, New Orleans, April 28 May 1, Battelle. *Bioremediation* v. 9, n. 4, p. 283-288. 1997.

WANG, W.; KETURI, P. H. Comparative Seed Germination Tests Using Ten Plant Species for Toxicity Assessment of a Metal Engraving Effluent Sample. *Water Air Soil Pollutant.*, v. 52, p. 369-376,1990.

WERKER, A.G. AND HALL, E.R. Limitations for biological removal of resin acids from pulp mill effluent. *Water Science and Technology*, 40 (n. 11-12): 281-288.1999.

WIEDEMEIER, T. H.; RIFAI, H. S.; NEWELL, C. J.; WILSON, J. T. Natural Attenuation of Fuels and Chlorinated Solvents in the Subsurface. 1a ed. Nova York: John Wily & Sons, 1999. 617p.

XIA, C.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production:cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnol Biofuels*, v. 4, n. 1, p.15.2011.

XUE,J.;GRIFT,T.E.;HANSEN,A.C. Effect of biodiesel on engine performances and emissions. *Renew. Sustain. Energy Rev.*15 (2).1098-1116.2011.

YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E.; BRES, P. A.; CRESPO, D. C.; RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, n.76, p.182-186, 2012.

ZHANG, X., PETERSON, C. L., REECE, D., MOLLER, G., HAWS, R. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Trans. ASAE*, 1423-1430, 1998.

ZIINO,M.;CURTO,R.B.L.;SALVO,F.;SIGNORINO,CHIOFALO,B.;GIUFFRIDA,D. Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture. *Bioresource Technol.*, 7-11,1999.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Caracterização físico-química do óleo diesel e biodiesel.

A Tabela A1 mostra a medida das massas específicas e curvas Figura A1 para os combustíveis: D e B100 nas temperaturas 20, 30 e 40 °C para formulação de Misturas Bx.

Tabela A1– Massa especifica para os D e B100. Fonte: UFPE-LAC.

Temperatura (° C)	Massa especifica (g.cm ⁻³)						
	D	B100					
		Biodiesel 1	Biodiesel 2	Biodiesel 3	Biodiesel 4	Biodiesel 5	Biodiesel 6
20	0,83856	0,88037	0,89045	0,88900	0,88534	0,88530	0,88900
30	0,83176	0,87307	0,88678	0,87956	0,87679	0,87689	0,87890
40	0,82458	0,86578	0,87007	0,86234	0,86567	0,87590	0,87600

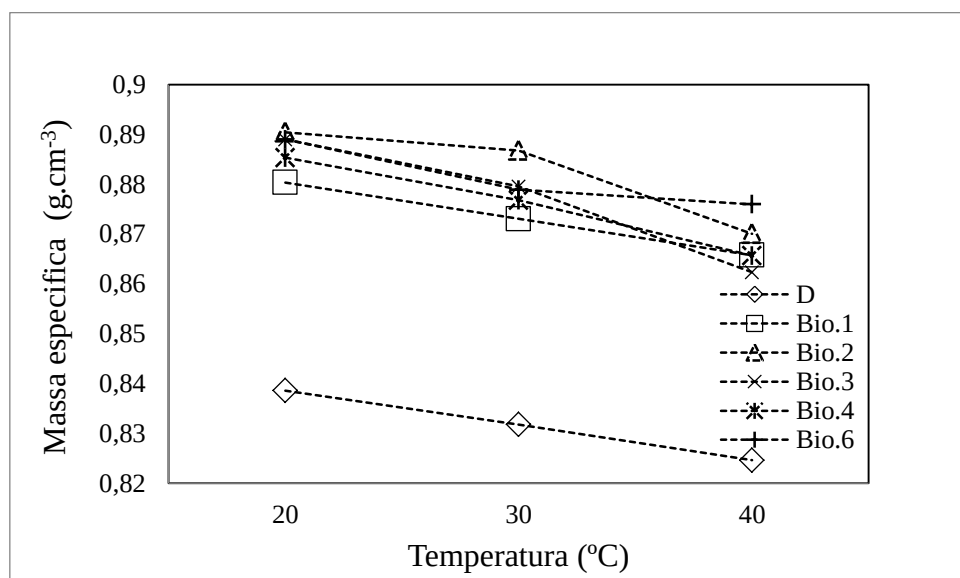


Figura A1– Curvas de massa especifica para os D e B100 a 20,30 e 40°C.

APÊNDICE B: Toxicidade

Resultados referentes aos parâmetros quantitativos de toxicidade de águas modelos usando-se como organismo-teste a *L. sativa* expressos em média $\pm$ desvio padrão (σ).

Tabela B1–Dados brutos: Efeito da acidez para as águas modelos formuladas com 5% (v/v) combustíveis e $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70 sobre os parâmetros de fitotoxicidade.

pH	D				B20				B100			
	G $\pm \sigma$ (%)	C $\pm \sigma$ (%)	IG $\pm \sigma$	I $\pm \sigma$ (%)	G $\pm \sigma$ (%)	C $\pm \sigma$ (%)	IG $\pm \sigma$	I $\pm \sigma$ (%)	G $\pm \sigma$ (%)	C $\pm \sigma$ (%)	IG $\pm \sigma$	I $\pm \sigma$ (%)
3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 1,4	62,4 $\pm$ 3,0	18,7 $\pm$ 0,9	70,0 $\pm$ 3,0
4	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 1,2	53,9 $\pm$ 2,5	16,1 $\pm$ 0,8	70,0 $\pm$ 3,0
5	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	20,0 $\pm$ 0,0	9,7 $\pm$ 0,0	1,94 $\pm$ 0,0	80,0 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 0,0	47,4 $\pm$ 2,3	14,2 $\pm$ 0,7	70,0 $\pm$ 3,0
6	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 0,0	14,1 $\pm$ 0,0	4,23 $\pm$ 0,0	70,0 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 0,0	52,6 $\pm$ 2,4	15,8 $\pm$ 0,7	70,0 $\pm$ 3,0
7	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	40,0 $\pm$ 0,0	16,0 $\pm$ 0,0	6,4 $\pm$ 0,0	60,0 $\pm$ 0,0	55,0 $\pm$ 2,7	52,9 $\pm$ 2,5	29,0 $\pm$ 1,3	45,0 $\pm$ 2,2

Tabela B2– Dados brutos: pH das águas modelos formuladas com Combustíveis (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%) (v/v) e $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70.

% C (v/v)	pH								
	D	B5	B7	B10	B20	B30	B40	B50	B100
1	6,36	6,68	6,33	6,45	6,44	6,56	6,51	6,31	6,10
2	6,41	6,64	6,22	6,45	6,24	6,55	6,39	6,81	6,02
3	6,41	6,64	6,21	6,45	6,20	6,54	6,38	6,72	6,04
4	6,38	6,65	6,21	6,45	6,18	6,54	6,37	6,63	6,20
5	6,41	6,66	6,20	6,45	6,16	6,54	6,36	6,53	6,14
6	6,39	6,66	6,20	6,44	6,14	6,55	6,34	6,44	6,03
7	6,38	6,66	6,19	6,44	6,11	6,55	6,33	6,34	6,05
8	6,38	6,67	6,18	6,43	6,10	6,54	6,32	6,30	6,04
9	6,36	6,67	6,17	6,42	6,08	6,54	6,30	6,29	6,17
10	6,36	6,69	6,16	6,42	6,06	6,54	6,29	6,15	6,21

Tabela B3– Dados brutos: Efeito da concentração para as águas modelos formuladas com combustíveis, D, B5, B7 em (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%) (v/v) e $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70 sobre os parâmetros de fitotoxicidade.

% C	D				B5				B7			
	G $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	C $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	IG $\pm$ $\bar{\sigma}$	I $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	G $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	C $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	IG $\pm$ $\bar{\sigma}$	I $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	G $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	C $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	IG $\pm$ $\bar{\sigma}$	I $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)
1	16,7 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,0	83,3 $\pm$ 4,1	26,7 $\pm$ 1,0	6,1 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,0	73,3 $\pm$ 3,0	30,0 $\pm$ 0,0	7,2 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,1	70,0 $\pm$ 0,0
2	13,3 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 0,1	0,55 $\pm$ 0,0	86,7 $\pm$ 4,0	26,7 $\pm$ 1,2	6,0 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,0	73,3 $\pm$ 3,4	26,7 $\pm$ 1,0	6,9 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,0	73,3 $\pm$ 3,4
3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
4	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
5	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
6	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
7	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
8	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
9	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
10	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0

Tabela B4– Dados brutos: Efeito da concentração para as águas modelos formuladas com combustíveis B10, B20, B30 em (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%) (v/v) e $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70 sobre os parâmetros de fitotoxicidade.

C (%)	B10				B20				B30			
	G $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	C $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	IG $\pm$ $\bar{\sigma}$	I $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	G $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	C $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	IG $\pm$ $\bar{\sigma}$	I $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	G $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	C $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)	IG $\pm$ $\bar{\sigma}$	I $\pm$ $\bar{\sigma}$ (%)
1	36,7 $\pm$ 1,63	7,4 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,1	63,3 $\pm$ 3,1	40,0 $\pm$ 1,7	7,7 $\pm$ 0,0	3,1 $\pm$ 0,1	60,0 $\pm$ 2,7	40,0 $\pm$ 0,0	7,6 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,1	60,0 $\pm$ 0,0
2	29,5 $\pm$ 0,0	6,3 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,0	70,0 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 1,3	6,4 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,0	86,7 $\pm$ 4,2	30,0 $\pm$ 0,0	6,3 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,0	70,0 $\pm$ 0,0
3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	90,0 $\pm$ 4,3	13,3 $\pm$ 0,6	4,2 $\pm$ 0,2	0,55 $\pm$ 0,0	86,7 $\pm$ 4,2
4	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
5	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
6	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
7	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
8	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
9	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
10	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0

Tabela B5– Dados brutos: Efeito da concentração para as águas modelos formuladas com combustíveis B40, B50 e B100 em (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%) (v/v) e $1,1 \times 10^{-2} \text{ g.cm}^{-3}$ de LESS70 sobre os parâmetros de fitotoxicidade.

C (%)	B40				B50				B100			
	G $\pm$ δ (%)	C $\pm$ δ (%)	IG $\pm$ δ	I $\pm$ δ (%)	G $\pm$ δ (%)	C $\pm$ δ (%)	IG $\pm$ δ	I $\pm$ δ (%)	G $\pm$ δ (%)	C $\pm$ δ (%)	IG $\pm$ δ	I $\pm$ δ (%)
1	40,0 $\pm$ 0,0	8,6 $\pm$ 0,0	3,4 $\pm$ 0,1	60,0 $\pm$ 0,0	43,3 $\pm$ 2,0	8,8 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,1	56,7 $\pm$ 2,4	60,0 $\pm$ 2,3	20,5 $\pm$ 1,0	12,2 $\pm$ 0,6	40,0 $\pm$ 1,7
2	36,7 $\pm$ 1,5	6,0 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1	63,3 $\pm$ 3,0	36,7 $\pm$ 1,3	6,7 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,1	63,3 $\pm$ 3,1	56,7 $\pm$ 2,4	15,4 $\pm$ 0,7	8,8 $\pm$ 0,0	43,3 $\pm$ 2,0
3	23,3 $\pm$ 1,1	5,0 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	76,7 $\pm$ 3,4	26,7 $\pm$ 1,1	5,0 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,0	73,3 $\pm$ 3,4	50,0 $\pm$ 2,3	14,1 $\pm$ 0	6,5 $\pm$ 0,3	50 $\pm$ 2,3
4	20,0 $\pm$ 0,0	4,2 $\pm$ 0,0	0,84 $\pm$ 0,0	80,0 $\pm$ 0,0	23,3 $\pm$ 1,1	4,7 $\pm$ 0,1	1,09 $\pm$ 0,0	76,7 $\pm$ 3,7	46,7 $\pm$ 2,2	11,5 $\pm$ 0,0	5,4 $\pm$ 0,2	53,3 $\pm$ 2,1
5	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	22,0 $\pm$ 0,0	4,3 $\pm$ 0,2	0,94 $\pm$ 0,0	78,0 $\pm$ 0,0	43,3 $\pm$ 2,0	10,2 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,2	56,7 $\pm$ 2,4
6	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	12,3 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 0,1	0,51 $\pm$ 0,0	87,7 $\pm$ 4,1	40,0 $\pm$ 0,0	10,2 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,2	60,0 $\pm$ 0,0
7	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	36,7 $\pm$ 1,4	9,7 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,0	63,3 $\pm$ 3,0
8	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	33,3 $\pm$ 1,2	9,5 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 0,1	66,7 $\pm$ 3,3
9	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 1,3	9,3 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,1	70,0 $\pm$ 2,7
10	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	30,0 $\pm$ 0,0	8,2 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,1	70,0 $\pm$ 0,0

Estudos preliminares - Micro-organismos não adaptados.

Tabela B6–Dados Brutos: Evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade da fase líquida da mistura reagente para os combustíveis D, B20 e B100 (micro-organismo não adaptado: *P. aeruginosa*).

Tempo (dias)	D				B20				B100			
	G± δ (%)	C± δ (%)	IG± δ	I± δ (%)	G± δ (%)	C± δ (%)	IG± δ	I± δ (%)	G± δ (%)	C± δ (%)	IG± δ	I± δ (%)
0	55,0±0,6	34,6±0,8	19,0±0,2	45,0±0,6	60,0±0,0	23,9±1,1	22,4±1,0	40,0±0,0	70,0±0,0	22,9±0,9	16,0±0,5	30,0±0,0
2	50,0±0,6	23,3±1,1	11,6±0,5	50,0±0,6	56,6±2,4	22,7±0,0	16,6±1,0	43,3±2,0	60,0±0,0	17,5±0,0	10,5±0,1	40,0±0,0
4	45,0±0,6	21,6±1,0	9,7±0,4	55,0±0,6	50,0±0,0	18,9±0,0	14,2±0,7	50,0±0,0	53,0±2,3	12,1±0,1	6,4±0,0	46,6±0,4
6	40,3±0,4	17,0±0,7	6,8±0,3	59,6±0,4	45,0±0,0	15,1±0,0	6,7±0,4	55,0±0,0	50,0±0,0	8,3±0,0	4,1±0,1	50,0±0,0
8	37,0±0,6	12,3±0,4	4,5±0,1	63,0±0,6	40,0±0,0	15,1±0,0	7,6±0,0	60,0±0,0	46,6±1,4	5,7±0,2	2,6±0,1	53,3±1,4
10	35,6±0,4	12,0±0,6	4,2±0,2	64,3±0,4	36,6±1,4	13,8±0,6	5,6±1,2	63,3±3,1	43,3±1,0	4,6±0,2	1,9±0,0	56,6±0,4
12	30,3±1,1	9,3±0,0	2,8±0,1	69,6±1,1	30,0±0,0	11,3±0,0	2,52±0,0	70,0±0,0	40,0±0,0	4,4±0,0	1,7±0,0	60,0±0,0

Tabela B7– Dados Brutos: Evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade da fase líquida da mistura reagente para os combustíveis D, B20 e B100 (micro-organismo não adaptado: *S. cerevisiae*).

Tempo (dias)	D				B20				B100			
	G± δ (%)	C± δ (%)	IG± δ	I± δ (%)	G± δ (%)	C± δ (%)	IG± δ	I± δ (%)	G± δ (%)	C± δ (%)	IG± δ	I± δ (%)
0	45,0±1,3	35,0±0,0	15,7±0,1	55,0±2,0	50,0±0,0	20,0±0,0	10,0±0,0	50,0±0,0	66,6±2,3	24,0±1,1	15,9±1,0	33,3±1,4
2	11,7±0,0	23,0±0,2	2,6±0,0	88,3±2,2	40,0±2,4	12,0±2,0	4,80±1,0	60,0±1,6	66,6±3,0	9,3±1,0	6,1±1,7	33,3±0,4
4	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0	36,6±2,0	12,0±1,3	4,39±0,0	63,4±0,0	47,0±0,0	9,1±1,3	4,2±0,8	53,3±0,0
6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0	30,0±0,0	11,9±0,0	3,5±0,0	70,0±0,0	43,3±1,4	6,4±1,7	2,7±0,6	56,6±1,4
8	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0	26,6±0,4	10,5±0,7	2,79±0,1	73,4±1,4	36,6±1,4	6,2±0,9	2,2±0,0	63,3±0,4
10	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0	20,0±2,0	10,0±0,0	2,0±0,2	80,0±0,1	33,3±0,4	4,7±1,1	1,5±0,3	66,6±0,2
12	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0	20,0±0,0	10,2±0,0	2,04±0,1	80,0±0,0	30,0±0,0	4,4±0,5	1,3±0,2	70,0±0,0

Estudos preliminares - Micro-organismos adaptados.

Tabela B8– Dados Brutos: Evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade da fase líquida da mistura reagente para os Combustíveis D, B20 e B100 (micro-organismo adaptado: *P. aeruginosa*).

Tempo (dias)	D				B20				B100			
	G± δ (%)	C±δ (%)	IG±δ	I±δ (%)	G±δ (%)	C±δ (%)	IG±δ	I±δ (%)	G±δ (%)	C±δ (%)	IG±δ	I±δ (%)
0	60,0±0,0	41,6±0,0	24,9±0,0	40,0±0,0	63,3±2,4	27,0±1,7	17,0±0,4	36,6±1,4	83,3±4,0	30,0±1,4	24,9±0,0	16,6±0,4
2	50,0±0,0	35,8±1,2	17,9±0,2	50,0±0,0	60,0±0,0	26,0±0,0	15,6±0,0	40,0±0,0	70,0±0,0	23,8±1,0	16,7±0,6	30,0±0,0
4	50,0±0,0	21,4±0,6	10,7±0,0	50,0±0,0	50,0±0,0	20,0±1,3	10,0±0,0	50,0±0,0	67,0±3,0	20,8±1,0	13,9±0,3	33,3±1,4
6	40,0±0,0	17,6±0,6	7,0±0,2	60,0±0,0	46,7±0,0	19,2±0,0	8,9±0,0	53,3±0,0	66,6±2,4	6,5±0,1	4,32±0,1	33,3±0,4
8	36,6±1,0	15,1±0,0	5,5±0,2	63,3±2,4	40,0±0,0	19,0±0,0	6,0±0,0	60,0±0,0	63,3±2,9	5,3±0,1	3,3±0,0	36,6±1,4
10	30,0±0,0	11,3±0,0	3,4±0,0	70,0±0,0	38,0±0,4	15,3±0,7	5,8±0,0	62,0±2,4	56,6±2,8	5,0±0,0	2,8±0,1	43,3±2,0
12	26,6±0,0	10,3±0,0	2,73±0,0	73,3±1,4	30,0±0,0	8,4±0,2	3,4±0,0	70,0±0,0	46,7±2,2	5,0±0,0	2,3±0,0	53,3±2,0

Tabela B9– Dados Brutos: Evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade da fase líquida da mistura reagente para os combustíveis D, B20 e B100 (micro-organismo aclimatado: *S. cerevisiae*).

Tempo (dias)	D				B20				B100			
	G± δ (%)	C±δ (%)	IG±δ	I±δ (%)	G±δ (%)	C±δ (%)	IG±δ	I±δ (%)	G±δ (%)	C±δ (%)	IG±δ	I±δ (%)
0	56,6±2,0	37,8±0,0	21,4±0,0	43,3±1,4	50,0±0,0	16,5±0,0	8,25±0,0	50,0±0,0	70,0±0,0	23,4±0,4	16,3±3,0	30,0±0,0
2	50,0±0,0	25,2±0,6	12,6±0,2	50,0±0,0	46,6±0,0	12,7±0,0	5,91±0,0	53,4±0,0	60,0±0,0	22,4±0,1	13,4±2,0	40,0±0,0
4	43,3±0,4	13,8±0,6	5,9±0,1	56,6±2,4	43,0±0,4	11,4±1,0	4,90±0,3	57,0±0,4	53,0±1,4	22,1±0,3	11,7±1,6	46,6±4,4
6	30,0±0,0	10,0±0,2	3,0±0,1	70,0±0,0	30,0±0,0	10,9±0,0	3,27±0,0	70,0±0,0	50,0±0,0	21,2±0,0	10,6±0,4	50,0±0,0
8	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0	30,0±0,0	10,1±0,0	3,03±0,0	70,0±0,0	46,6±0,4	12,7±0,2	5,9±1,0	53,3±1,4
10	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0	26,6±0,0	9,8±0,4	2,60±0,0	73,4±1,4	43,3±0,0	8,4±0,1	3,6±0,8	56,6±0,4
12	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	100,0±0,0	22,0±0,0	9,3±0,0	2,04±0,0	80,0±0,0	33,3±0,4	8,3±0,0	2,7±0,0	66,6±1,9

Tabela B10–Dados brutos: Evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade da fase líquida da mistura reagente para o B100 (Ensaio 1).

Tempo (dias)	B100			
	$G \pm \delta$ (%)	$C \pm \delta$ (%)	$IG \pm \delta$	$I \pm \delta$ (%)
0	96,0 $\pm$ 1,0	11,4 $\pm$ 0,4	10,9 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,4
3	92,0 $\pm$ 0,0	11,2 $\pm$ 0,4	10,3 $\pm$ 0,0	8,0 $\pm$ 0,0
7	90,0 $\pm$ 0,0	11,0 $\pm$ 0,0	9,9 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,5
12	80,0 $\pm$ 0,00	10,3 $\pm$ 0,1	8,2 $\pm$ 0,3	20,0 $\pm$ 0,0
17	76,6 $\pm$ 1,2	9,0 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,1	23,3 $\pm$ 0,3
22	70,0 $\pm$ 0,0	7,5 $\pm$ 0,0	5,2 $\pm$ 0,2	30,0 $\pm$ 0,0
27	66,6 $\pm$ 0,6	6,9 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,0	33,3 $\pm$ 1,0
34	63,3 $\pm$ 1,1	6,3 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,0	36,6 $\pm$ 0,2
41	60,0 $\pm$ 0,0	6,1 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,0	40,0 $\pm$ 0,0
48	56,6 $\pm$ 0,5	6,0 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,1	43,3 $\pm$ 0,2
55	50,0 $\pm$ 0,0	5,5 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,0	50,0 $\pm$ 0,0
62	46,6 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,2	53,3 $\pm$ 0,0

Tabela B11 –Dados brutos: Evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade da fase líquida da mistura reagente para o B100 (Ensaio 2).

Tempo (dias)	B100			
	$G \pm \delta$ (%)	$C \pm \delta$ (%)	$IG \pm \delta$	$I \pm \delta$ (%)
0	96,6 $\pm$ 0,4	13,4 $\pm$ 0,4	12,9 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,0
3	93,3 $\pm$ 1,4	11,3 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 0,4	6,6 $\pm$ 0,2
7	86,6 $\pm$ 0,0	11,0 $\pm$ 0,0	9,5 $\pm$ 0,0	13,3 $\pm$ 0,5
12	83,3 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 0,3	8,7 $\pm$ 0,4	16,6 $\pm$ 0,5
17	76,6 $\pm$ 0,1	9,4 $\pm$ 0,1	7,2 $\pm$ 0,3	23,3 $\pm$ 0,0
22	73,3 $\pm$ 0,6	7,7 $\pm$ 0,3	5,6 $\pm$ 0,1	26,6 $\pm$ 0,0
27	66,6 $\pm$ 0,1	7,1 $\pm$ 0,1	4,7 $\pm$ 0,2	33,3 $\pm$ 0,0
34	63,3 $\pm$ 0,9	6,5 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,1	36,6 $\pm$ 1,6
41	60,0 $\pm$ 0,0	6,3 $\pm$ 0,0	3,7 $\pm$ 0,0	40,0 $\pm$ 0,0
48	56,6 $\pm$ 1,0	6,2 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,1	43,3 $\pm$ 1,4
55	53,3 $\pm$ 0,4	5,8 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,1	46,6 $\pm$ 1,9
62	53,3 $\pm$ 0,8	5,5 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,0	46,6 $\pm$ 0,0

Tabela B12–Dados brutos: Evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade da fase líquida da mistura reagente para o B20 (Ensaio 3).

Tempo (dias)	B20			
	$G \pm \delta$ (%)	$C \pm \delta$ (%)	$IG \pm \delta$	$I \pm \delta$ (%)
0	60,0 $\pm$ 0,0	11,9 $\pm$ 0,0	7,1 $\pm$ 0,0	40,0 $\pm$ 0,0
3	56,6 $\pm$ 2,4	10,8 $\pm$ 0,0	6,1 $\pm$ 0,4	43,3 $\pm$ 1,4
7	43,3 $\pm$ 1,4	9,1 $\pm$ 0,0	3,9 $\pm$ 0,4	56,6 $\pm$ 1,0
12	33,3 $\pm$ 0,3	8,2 $\pm$ 0,0	2,7 $\pm$ 0,3	66,6 $\pm$ 1,4
17	30,0 $\pm$ 0,0	7,8 $\pm$ 0,0	2,3 $\pm$ 0,0	70,00 $\pm$ 0,0
22	20,0 $\pm$ 0,0	4,2 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,0	76,66 $\pm$ 1,2
27	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
34	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
41	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
48	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
55	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
62	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0

Tabela B13– Dados brutos: Evolução dinâmica dos parâmetros de fitotoxicidade da fase líquida da mistura reagente para o B100 (Ensaio sob a velocidade de agitação a 750 rpm e 2000 rpm).

Tempo (segundos)	B100			
	750 rpm		2000 rpm	
	$G \pm \partial$ (%)	$I \pm \partial$ (%)	$C \pm \partial$ (%)	$I \pm \partial$ (%)
0	4,5 $\pm$ 0,0	40,0 $\pm$ 0,0	3,9 $\pm$ 0,0	40,0 $\pm$ 0,0
300	4,0 $\pm$ 0,1	45,0 $\pm$ 0,0	4,0 $\pm$ 0,0	40,0 $\pm$ 0,0
600	4,1 $\pm$ 0,0	50,0 $\pm$ 0,0	3,8 $\pm$ 0,0	53,3 $\pm$ 0,3
900	3,8 $\pm$ 0,5	52,0 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,0	53,3 $\pm$ 0,5
1.200	3,5 $\pm$ 0,0	53,5 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,0	55,0 $\pm$ 0,0
1.800	3,3 $\pm$ 0,8	55,2 $\pm$ 0,0	4,2 $\pm$ 0,0	56,7 $\pm$ 0,8
3.000	3,4 $\pm$ 0,0	55,0 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,0	60,0 $\pm$ 0,0
4.800	3,1 $\pm$ 0,2	57,2 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	50,0 $\pm$ 0,5
7.200	3,2 $\pm$ 0,1	60,0 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 0,0	56,7 $\pm$ 0,3
10.200	3,1 $\pm$ 0,0	62,0 $\pm$ 0,9	3,1 $\pm$ 0,0	60,0 $\pm$ 0,2
13.800	3,2 $\pm$ 0,0	64,0 $\pm$ 0,0	3,2 $\pm$ 0,0	65,0 $\pm$ 0,0
18.000	3,0 $\pm$ 0,0	66,7 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,0	55,0 $\pm$ 0,1
22.800	3,5 $\pm$ 0,0	72,8 $\pm$ 0,5	4,5 $\pm$ 0,0	46,7 $\pm$ 0,2
28.200	3,1 $\pm$ 0,0	74,0 $\pm$ 0,0	3,5 $\pm$ 0,0	36,7 $\pm$ 0,1

APÊNDICE C: Concentração de Biomassa

Tabela C1–Dados brutos: Densidade ótica da suspensão microbiana a 600 nm (D.O._{600nm}) e número de células viáveis/cm³ para a *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae*.

Tempo (horas)	<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
	D.O.*	UFC.cm ⁻³	ln (UFC.cm ⁻³)	D.O.*	UFC.cm ⁻³	ln (UFC.cm ⁻³)
0	0,04	1,00E+04	9,21	0,08	1,00E+04	9,21
2	0,043	1,00E+04	9,21	0,09	1,20E+04	9,39
4	0,05	2,00E+04	9,90	0,11	1,70E+04	9,74
5	0,07	5,00E+04	10,82	0,14	2,00E+05	12,21
6	0,107	8,00E+05	13,59	0,2	8,00E+05	13,59
7	0,14	3,00E+06	14,91	0,23	4,00E+06	15,20
8	0,2	9,00E+06	16,01	0,26	1,00E+07	16,12
9	0,31	2,00E+07	16,81	0,284	1,30E+07	16,38
10	0,33	5,70E+07	17,86	0,34	1,00E+07	16,12
11	0,385	6,40E+07	17,97	0,35	2,60E+06	14,77
12	0,396	2,15E+07	16,88	0,36	3,00E+05	12,61
13	0,4	2,00E+06	14,51	0,36	1,00E+05	11,51

*comprimento de onda 600nm

Estudos preliminares - Micro-organismos não adaptados.

Tabela C2– Dados Brutos: Evolução dinâmica da concentração de biomassa em fase líquida usando *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* não adaptados. (Sistemas: H₂O-D; H₂O-B20; H₂O-B100).

Tempo (dias)	Concentração (UFC.cm ⁻³)					
	<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
	D	B20	B100	D	B20	B100
0	5,00E+07	6,00E+07	6,20E+07	3,00E+07	4,20E+07	5,00E+07
2	5,20E+07	6,10E+07	6,30E+07	4,00E+07	5,00E+07	6,00E+07
4	5,50E+07	6,30E+07	5,30E+07	5,20E+07	5,30E+07	5,50E+07
6	5,10E+06	5,60E+06	6,00E+06	5,10E+06	5,00E+06	5,40E+06
8	4,00E+06	5,30E+06	5,00E+06	4,00E+06	5,00E+06	5,00E+06
10	1,00E+06	5,00E+06	4,00E+06	3,00E+06	4,60E+06	2,00E+06
12	6,70E+05	4,00E+05	2,00E+05	7,00E+05	4,00E+05	3,00E+05

Estudos preliminares - Micro-organismos adaptados.

Tabela C3– Dados Brutos: Evolução dinâmica da concentração de biomassa em fase líquida usando *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* adaptados (Sistemas: H₂O-D; H₂O-B20; H₂O-B100).

Tempo (dias)	Concentração (UFC.cm ⁻³)					
	<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
	D	B20	B100	D	B20	B100
0	3,30E+07	5,20E+07	2,00E+07	3,00E+07	6,20E+07	1,00E+07
2	5,70E+07	6,00E+07	3,20E+07	5,00E+07	8,00E+07	2,20E+07
4	4,50E+07	3,60E+07	4,00E+07	4,00E+07	4,30E+07	4,00E+07
6	5,70E+06	3,00E+06	5,60E+06	3,20E+06	4,60E+06	6,60E+06
8	4,00E+06	2,00E+06	3,40E+06	3,00E+06	4,00E+06	5,00E+06
10	3,00E+06	2,00E+06	1,00E+06	3,00E+06	2,00E+06	4,00E+06
12	6,00E+05	3,00E+05	1,00E+05	5,00E+05	3,00E+05	2,00E+05

***P. aeruginosa* adaptada ao B100 / B100 / T= 30 °C / biorreator, a 250 rpm.**

Tabela C4–Dados Brutos: Evolução dinâmica da concentração de biomassa em fase líquida usando *P. aeruginosa* adaptada. (Sistema: H₂O-B100).

Tempo (dias)	Concentração (UFC.cm ⁻³)
0	3,00E+07
3	3,70E+07
7	5,00E+07
12	7,80E+06
17	6,00E+06
22	5,70E+06
27	8,00E+05
34	5,70E+05
41	5,00E+05
48	3,00E+05
55	4,00E+04
62	2,50E+04

Tabela C5– Dados Brutos: Evolução dinâmica da concentração de biomassa em fase líquida usando *P. aeruginosa* adaptada (C:N 50:1). (Sistema: H₂O-B100).

Tempo (dias)	Concentração (UFC.cm ⁻³)
0	1,00E+07
3	5,00E+07
7	5,30E+07
12	3,00E+07
17	7,30E+06
22	6,00E+06
27	1,80E+06
34	1,00E+06
41	6,70E+05
48	5,70E+05
55	5,00E+05
62	2,00E+04

Tabela C6– Dados Brutos: Evolução dinâmica da concentração de biomassa em fase líquida usando *P. aeruginosa* adaptada (C:N 50:1). (Sistema: H₂O-B20).

Tempo (dias)	Concentração (UFC.cm ⁻³)
0	2,00E+07
3	3,00E+07
7	6,30E+07
12	6,00E+06
17	3,00E+06
22	1,90E+06
27	1,00E+06
34	5,00E+05
41	4,10E+05
48	2,70E+05
55	4,20E+04
62	1,00E+04

APÊNDICE D: pH

Estudos preliminares - Micro-organismos não adaptados.

Tabela D1– Dados Brutos: Evolução dinâmica do pH em fase líquida usando *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* não adaptados (Sistemas: H₂O-D; H₂O-B20; H₂O-B100).

Tempo (dias)	pH					
	<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
	D	B20	B100	D	B20	B100
0	6,30	6,00	6,10	6,34	6,20	6,33
2	6,06	5,88	5,98	5,98	5,70	6,10
4	6,00	5,57	5,77	5,04	5,20	5,78
6	5,95	5,50	5,35	5,00	5,05	5,05
8	5,41	5,36	5,29	5,00	4,77	4,93
10	5,30	5,22	5,20	4,85	4,50	4,70
12	5,10	5,00	4,20	4,44	4,40	4,29

Estudos preliminares - Micro-organismos adaptados.

Tabela D2– Dados Brutos: Evolução dinâmica do pH em fase líquida usando *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* adaptados (Sistemas: H₂O-D; H₂O-B20; H₂O-B100).

Tempo (dias)	pH					
	<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
	D	B20	B100	D	B20	B100
0	6,68	6,42	6,90	6,86	6,58	6,13
2	6,34	5,63	6,67	6,80	5,82	5,74
4	6,16	5,61	5,73	6,76	5,77	5,70
6	5,94	5,33	5,60	6,51	5,50	5,67
8	5,81	5,20	5,29	6,00	5,10	5,55
10	5,49	5,08	5,21	5,45	5,00	5,09
12	5,00	4,70	4,55	5,01	4,86	4,47

Tabela D3– Dados Brutos: Evolução dinâmica do pH da fase líquida usando *P. aeruginosa* adaptada. (Sistema: H₂O-B100).

Tempo (dias)	pH
0	6,50
3	6,30
7	6,10
12	6,00
17	5,89
22	5,72
27	5,70
34	5,50
41	5,40
48	5,25
55	4,90
62	4,70

Tabela D4– Dados Brutos: Evolução dinâmica do pH da fase líquida usando *P. aeruginosa* adaptada (C:N 50:1). (Sistema: H₂O-B100).

Tempo (dias)	pH
0	6,50
3	6,01
7	6,00
12	5,93
17	5,72
22	5,70
27	5,58
34	5,10
41	5,00
48	4,37
55	4,10
62	3,50

Tabela D5– Dados Brutos: Evolução dinâmica do pH da fase líquida usando *P. aeruginosa* adaptada (C:N 50:1). (Sistema: H₂O-B20).

Tempo (dias)	pH
0	6,34
3	6,01
7	6,00
12	5,77
17	5,71
22	5,70
27	5,67
34	5,59
41	5,50
48	5,23
55	5,00
62	4,70

APÊNDICE E**B100 (5%) / Fotorreator anular fotolisado a 254 nm, sob agitação orbital 750 rpm.**Tabela E7– Dados Brutos: Dados Brutos: Evolução dinâmica do pH, relação DQO/DBO₅ da fase líquida. (Sistema: H₂O-B100).

Tempo (segundos)	pH	DQO. (DBO ₅) ⁻¹
0	6,00	16,69
300	5,80	28,4
600	5,00	29,42
900	4,78	23,31
1.200	4,70	22,76
1.800	4,66	24,04
3.000	4,56	25,44
4.800	4,54	21,19
7.200	4,44	42,71
10.200	4,37	37,12
13.800	4,30	22,65
18.000	4,28	37,61
22.800	4,00	40,84
28.200	3,5	47,15

B100 (5%) / Fotorreator anular fotolizado a 254 nm, sob agitação orbital 2000 rpm.

Tabela E9– Dados Brutos: Evolução dinâmica do pH, relação DQO/DBO₅ da fase líquida. (Sistema: H₂O-B100).

Tempo (segundos)	pH	DQO. (DBO ₅) ⁻¹
0	6,40	41,65
300	6,28	11,46
600	6,15	12,27
900	6,05	7,61
1.200	6,00	6,54
1.800	5,75	6,13
3.000	5,68	8,02
4.800	5,60	11,84
7.200	5,50	13,94
10.200	5,47	9,59
13.800	5,40	9,21
18.000	5,36	9,57
22.800	5,00	7,95
28.200	4,90	7,37

APÊNDICE F: Teor de Ésteres Totais e Concentração de ésteres de ácidos graxos.

Tabela F1– Dados brutos: Perfis dinâmicos do teor em área dos principais EMAG presentes na mistura ao longo do processo de biodegradação do B100 (Ensaio 2).

Tempo (dias)	Teor em massa dos EMAG [%]							Teor total em massa dos EMAG [%]
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	
0	0,80	24,95	0,46	11,54	58,94	2,29	0,69	99,67
3	0,00	21,32	0,56	15,61	58,60	2,72	0,82	99,63
7	0,00	21,61	0,66	15,58	58,32	2,71	0,80	99,68
12	0,66	15,76	0,63	19,87	58,39	3,28	0,65	99,61
17	0,92	16,16	0,64	20,43	57,68	3,21	0,36	99,4
22	0,01	15,51	0,64	22,01	57,1	3,28	0,61	99,85
27	0,10	16,78	0,83	0,02	22,75	3,49	0,58	45,29
34	0,07	13,47	0,77	25,53	54,9	3,79	0,65	99,83
41	3,97	21,81	25,77	2,47	24,86	5,96	0,11	84,95
48	0,00	17,39	1,32	0,00	29,97	5,73	1,10	56,87
55	0,00	8,00	0,85	35,1	40,63	4,26	0,0	88,84
62	0,00	8,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	8,69

Tabela F2– Dados brutos: Perfis dinâmicos do teor em área dos principais EMAG presentes na mistura ao longo do processo de biodegradação do B100 (Ensaio 1).

Tempo (dias)	Teor em massa dos EMAG [%]							Teor total em massa dos EMAG [%]
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	
0	0,89	25,91	0,52	11,00	58,20	2,56	0,78	99,86
3	0,00	23,00	0,63	14,47	58,10	2,50	0,60	99,30
7	0,00	21,19	0,74	15,44	58,00	3,00	0,69	99,06
12	0,54	17,63	4,00	18,00	54,80	2,40	0,60	98,19
17	1,03	18,08	0,72	21,00	54,00	2,20	0,41	97,44
22	0,01	17,36	0,72	20,62	56,00	3,67	0,69	99,85
27	0,11	18,78	0,92	0,02	25,46	3,91	0,65	50,68
34	0,08	14,07	0,86	20,57	58,00	4,24	0,73	99,28
41	0,00	20,40	28,84	2,76	27,81	6,67	0,12	86,60
48	0,00	19,45	1,48	0,00	33,53	6,41	1,23	62,10
55	0,00	8,55	0,95	39,27	45,47	4,77	0,00	99,01
62	0,00	9,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,72

B100 (5%) / Fotorreator anular fotolisado a 254 nm, sob agitação orbital 2000 rpm.

Tabela F3– Dados Brutos: Perfis dinâmicos do teor em massa dos principais EMAG presentes na mistura ao longo do processo de degradação do B100.

Tempo (segundos)	Teor em massa dos EMAG [%]					Teor total em massa dos EMAG [%]
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	
0	2,60	28,17	2,71	14,47	52,05	100,00
300	0,00	6,42	0,00	3,56	12,68	22,66
600	0,00	8,33	0,78	4,40	15,49	29,00
900	0,00	14,27	1,42	7,70	27,63	51,02
1.200	0,00	19,29	2,16	11,86	42,40	75,71
1.800	0,00	2,49	0,71	1,44	5,04	9,68
3.000	0,00	9,52	0,84	4,69	16,69	31,74
4.800	0,00	18,66	1,82	9,98	35,80	66,26
7.200	0,00	7,75	0,98	5,27	18,68	32,68
10.200	0,00	6,58	0,00	3,58	12,34	22,5
13.800	0,00	9,97	0,91	5,26	18,71	34,85
18.000	0,00	7,10	0,66	3,67	12,87	24,3
22.800	0,00	5,04	0,00	2,66	9,27	16,97
28.200	0,00	3,92	0,00	2,02	6,72	12,66

B100 (5%) / Fotorreator anular fotolisado a 254 nm, sob agitação orbital 750 rpm.

Tabela F4– Dados Brutos: Perfis dinâmicos do teor em massa dos principais EMAG presentes na mistura ao longo do processo de degradação do B100.

Tempo (segundos)	Teor em massa dos EMAG [%]							Teor total em massa dos EMAG [%]
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	
0	0,70	24,95	0,40	11,40	59,94	2,00	0,59	100,00
300	0,00	21,15	0,50	15,11	59,62	2,62	0,82	99,81
600	0,00	20,95	0,50	15,51	59,34	2,71	0,70	99,71
900	0,66	15,11	0,63	19,88	59,41	3,28	0,60	99,95
1.200	0,92	15,61	0,64	19,13	58,70	3,21	0,36	98,58
1.800	0,01	15,52	0,64	22,01	57,12	3,28	0,61	99,90
3.000	0,10	16,79	0,83	0,02	22,76	3,49	0,58	45,32
4.800	0,07	13,47	0,77	25,54	54,38	3,79	0,65	99,33
7.200	3,97	21,81	25,78	2,47	24,86	5,96	0,11	84,96
10.200	0,00	17,39	1,32	0,00	29,98	5,73	1,10	56,88
13.800	0,00	8,01	0,85	35,11	40,64	4,26	0,00	89,16
18.000	0,00	8,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,69
22.800	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,01	0,06
28.200	0,00	0,02	0,00	0,05	0,00	0,01	0,00	0,08

ANEXOS

ANEXO A

Tabela A1- Especificação do biodiesel segundo Regulamento Técnico ANP N° 3/2014.

Propriedade	Unidade	Limite	Método		
			ABNT/ NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1) (2)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m ³	850-900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx.	mg/kg	200,0 (3)	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx.(13)	mg/kg	24	15995	-	EN ISO 12662 (5)
Ponto de fulgor, mín. (4)	° C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín.	% massa	96,5	15764	-	EN 14103 (5)
Cinzas sulfatadas, máx.(6)	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867	5453	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 (5) EN 14109 (5) EN 14538 (5)
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538 (5)
Fósforo, máx. (7)	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107 (5) EN 16294 (5)
Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C, máx. (6)	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número Cetano (6)	-	Anotar	-	613 6890 (8)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	° C	(9)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448 -	664 -	- EN 14104 (5)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15771 15908 (5)	6584 (5) -	EN 14105 (5) EN 14106 (5)
Glicerol total, máx.(10)	% massa	0,25	15344 15908 (5)	6584 (5) -	EN 14105 (5)
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,7	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Metanol e/ou etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110 (5)
Índice de iodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111 (5)
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín. (11)	h	6 (12)	-	-	EN 14112 (5) EN 15751 (5)

Fonte: ANP (2014).

Notas:(1) Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio. Em caso de disputa, o produto só poderá ser considerado como não especificado no Aspecto, caso os parâmetros teor de água e/ou contaminação total estejam não conformes. (2) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade no Aspecto, deverão ser realizadas as análises de teor de água e contaminação total. O produto será reprovado caso pelo menos um desses dois últimos parâmetros esteja fora de especificação.(3) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade, será admitida variação de +50 mg/kg no limite do teor de água no biodiesel para o produtor e de +150 mg/kg para o distribuidor.(4) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130°C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.(5) Os métodos referenciados demandam validação para os materiais graxos não previstos no método e rota de produção etílica.(6) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da Tabela de Especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados à ANP pelo Produtor de biodiesel, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de material graxo, o Produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de materiais graxos utilizados. (7) Em caso de disputa, deve ser utilizado o método EN 14107 como referência.(8) O método ASTM D6890 poderá ser utilizado como método alternativo para determinação do número de cetano.(9) Limites conforme Tabela II. Para os estados não contemplados na tabela o ponto de entupimento a frio permanecerá 19°C. (10) Poderá ser determinado pelos métodos ABNT NBR 15908, ABNT NBR 15344, ASTM D6584 ou EN14105, sendo aplicável o limite de 0,25% em massa. Para biodiesel oriundo de material graxo predominantemente láurico, deve ser utilizado método ABNT NBR 15908 ou ABNT NBR 15344, sendo aplicável o limite de 0,30% em massa (11) O limite estabelecido deverá ser atendido em toda a cadeia de abastecimento do combustível. (12) A estabilidade à oxidação a 110 °C terá seu limite mínimo de 8 horas, a partir de 1º de novembro de 2014. (13) Deverá ser utilizada somente a versão da norma de 1998 ou 2008 (EN 12662:1998 ou EN 12662:2008)

Tabela A2– Propriedades físico-químicas do óleo diesel. Fonte: ANP, 2013.

CARACTERÍSTICA (1)	UNIDADE	LIMITE		MÉTODO	
		TIPO A e B		ABNT NBR	ASTM/EN
		S10	S500		
Aspecto (2) (22) (23)	-	Límpido e isento de impurezas		14954	D4176
<u>(Nota)</u>					
Cor	-	(3)	Vermelho (4)		
Cor ASTM, máx. (5)	-	3,0		14483	D1500 D6045
Teor de biodiesel (6)	% volume	(7)		15568	EN 14078
Enxofre total, máx. (21)	mg/kg	10,0 (8)	-	-	D2622 D5453 D7039 D7212 (9) D7220
		-	500	14533 (9)	D2622 D4294 (9) D5453 D7039 D7220
<u>(Nota)</u>					
Destilação					
10% vol., recuperados, mín.	°C	180,0	Anotar	9619	D86
50% vol., recuperados		245,0 a 295,0	245,0 a 310,0		
85% vol., recuperados, máx.		-	360,0		
90% vol., recuperados		-	Anotar		
95% vol., recuperados, máx.		370,0	-		
Massa específica a 20°C	kg/m³	815,0 a 850,0 (10)	815,0 a 865,0	7148 14065	D1298 D4052
Ponto de fulgor, mín.	°C	38,0		7974 14598	D56 D93 D3828 D7094
<u>(Nota)</u>					
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm²/s	2,0 a 4,5	2,0 a 5,0	10441	D445
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	(11)		14747	D6371
Número de cetano, mín. ou Número de	-	48	42 (12)	-	D613

cetano derivado (NCD), mín.					D6890 D7170
Resíduo de carbono Ramsbot-tom no resíduo dos 10% finais da destilação, máx.	% massa	0,25		14318	D524
Cinzas, máx.	% massa	0,010		9842	D482
Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C, máx	-	1		14359	D130
Teor de Água (13), máx.	mg/kg	200	500	-	D6304 EN ISO 12937
Contaminação total (14), máx.	mg/kg	24	-	-	EN 12662
Água e sedimentos, máx. (14)	% volume	-	0,05	-	D2709
<u>(Nota)</u>					
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (9) (15), máx.	% massa	11	-	-	D5186 D6591 EN 12916
<u>(Nota)</u>					
Estabilidade à oxidação (15), máx.	mg/100mL	2,5	-	-	D2274 (17) D5304 (17)
Índice de Acidez (24)	mg KOH/g	Anotar	-	14248	D664 D974
<u>(Nota)</u>					
Lubricidade, máx.	µm	(18)			ISO 12156 D6079
Condutividade elétrica, mín. (19)	pS/m	25	25 (20)	- -	D2624 D4308

*Resolução ANP 50 (23/12/2013).

Nota:

A Resolução ANP nº 69, de 23.12.2014 – DOU 24.12.2014 - Efeitos a partir de 24.12.2014 acrescentou na característica Ponto de Fulgor desta Tabela o método D7094.

A Resolução ANP nº 69, de 23.12.2014 – DOU 24.12.2014 - Efeitos a partir de 24.12.2014 acrescentou na característica Índice de Neutralização desta Tabela o método D664

- (1) Poderão ser incluídas nesta especificação outras características, com seus respectivos limites, para óleo diesel obtido de processo diverso de refino e processamento de gás natural ou a partir de matéria prima distinta do petróleo.
- (2) Deverá ser aplicado o procedimento 1 para cada método.
- (3) Usualmente de incolor a amarelada, podendo apresentar-se ligeiramente alterada para as tonalidades marrom e alaranjada devido à coloração do biodiesel.
- (4) O corante vermelho, especificado conforme a Tabela III, deverá ser adicionado no teor de 20 mg/L de acordo com o artigo 12.
- (5) Limite requerido antes da adição do corante.
- (6) Aplicável apenas para o óleo diesel B.
- (7) No percentual estabelecido pela legislação vigente. Será admitida variação de $\pm 0,5$ % volume. A norma EN 14078 é de referência em caso de disputa para a determinação do teor de biodiesel no óleo diesel B.

(8) Para efeito de fiscalização nas autuações por não conformidade, será admitida variação de +5 mg/kg no limite da característica teor de enxofre do óleo diesel B S10, nos segmentos de distribuição e revenda de combustíveis.

(9) Aplicável apenas para óleo diesel A.

(10) Será admitida a faixa de 815 a 853 kg/m³ para o óleo diesel B.

(11) Limites conforme Tabela II.

(12) Para o óleo diesel A, alternativamente, fica permitida a determinação do índice de cetano calculado pelo método ASTM D4737, quando o produto não contiver aditivo melhorador de cetano, com limite mínimo de 45. No caso de o resultado ser inferior a 45, o ensaio de número de cetano deverá ser realizado. Quando for utilizado aditivo melhorador de cetano, esta informação deverá constar no Certificado da Qualidade.

(Nota)

(13) Aplicável na produção e na importação do óleo diesel A S10 e A S500 e a ambos os óleos diesel B na distribuição.

(Nota)

(14) Aplicável na importação, antes da liberação do produto para comercialização.

(15) Os resultados da estabilidade à oxidação e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos poderão ser encaminhados ao distribuidor até 48 h após a comercialização do produto de modo a garantir o fluxo adequado do abastecimento. A partir de 1º de janeiro de 2015, o resultado do teor hidrocarbonetos policíclicos aromáticos deverá constar no Certificado da Qualidade no ato da comercialização do produto.

(16) Excluída.

(Nota)

(17) Os métodos ASTM D2274 e D5304 aplicam-se apenas ao óleo diesel A.

(18) Poderá ser determinada pelos métodos ISO 12156 ou ASTM D6079, sendo aplicáveis os limites de 460 µm e 520 µm, respectivamente. A medição da lubricidade deverá ser realizada em amostra com biodiesel, no teor estabelecido pela legislação vigente, em conformidade com o § 9º do Art. 9º.

(19) Limite requerido no momento e na temperatura do carregamento/bombeio do combustível pelo produtor, importador e distribuidor. Para o óleo diesel A S500 deverá ser informado no Certificado da Qualidade a concentração de aditivo antiestático adicionada.

(20) A condutividade elétrica será determinada em amostra composta constituída da mistura de aditivo antiestático mais corante com o produto a ser comercializado. O teor de corante nesta amostra deverá estar conforme o indicado na Tabela III.

(21) Em caso de disputa, a norma ASTM D5453 deverá ser utilizada.

(Nota)

(22) Em caso de disputa, o produto será considerado como não especificado na característica Aspecto, caso ao menos um entre os parâmetros teor de água e água e sedimentos, para o óleo diesel S500, e um entre os parâmetros teor de água e contaminação total, para o óleo diesel S10, esteja não conforme.

(Nota)

(23) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade no Aspecto, deverão ser realizadas as análises de teor de água e água e sedimentos, para o óleo diesel S500, ou teor de água e contaminação total, para o óleo diesel S10. O produto será reprovado caso ao menos um desses parâmetros esteja fora de especificação.

(Nota)

(24) Em caso de disputa, a norma ASTM D974 deverá ser utilizada.

(Nota)

Tabela A2– Certificado de ensaio óleo diesel S500. Fonte: Petrobras Transportes S.A.

Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
Aspecto	D 4176	PASS (1)	PASS	N/A
Cor	VIS 000	INAM (2)	INAM	N/A
Cor ASTM	D 1500	3,0 máx.	L 1,5	N/A
10% Recuperados	D 86	Anotar	167,7	°C
50% Recuperados	D 86	245,0 a 310,0	257,0	°C
85% recuperados	D 86	360,0 máx.	343,2	°C
90% recuperados	D 86	Anotar	362,0	°C
Enxofre total	D 4294	500 máx.	404	mg/kg
Massa específica 20 GC	D 4052	815,0 a 865,0	841,3	Kg/m ³
Viscosidade cinemática a 40 GC	D 445	2,0 a 5,0	2,444	mm ² /s
Corrosividade ao cobre, 3h 50 GC	D 130	1 máx.	1A	N/A
Ponto de entupimento	D 6371	7 máx.	3	°C
Cinzas	D 482	0,010 máx.	< 0,0010	% massa
RCR nos 10% finais da destilação	D 524	0,25 máx.	0,10	% massa
Número cetano - NCD	D 6890	42 min.	44,0	N/A
Ponto de fulgor	D 93	38,0 min.	44,0	°C
Condutividade elétrica	D 2624	25 min. (3)	180	pS/m
Temperatura observada	D 2624	Anotar	19,7	°C

Notas:

Todos os limites especificados são valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29.

Cor vermelha- Corante adicionado na entrega do produto.

-Resolução ANP nº 50 de 23 Dezembro de 2013 –DOU 24.12.13.

(1) PASS (PASSA) = Límpido e isento de impurezas.

(2) INAM = Incolor a amarelada, isenta de corantes.

(3) Aditivo melhorador de condutividade elétrica adicionado na concentração de 2,0 mg/L.