UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

Programa de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

ESTUDO PARA VIABILIDADE DO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR MICROBIANO PARA METANO E METANOL EM COMBUSTÍVEIS

Andréa dos Santos Rodrigues

Abril
2013

Andréa dos Santos Rodrigues

ESTUDO PARA VIABILIDADE DO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR MICROBIANO PARA METANO E METANOL EM COMBUSTÍVEIS

Tese submetida ao corpo docente do curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadoras: **Andréa Medeiros Salgado**
Belkis Valdman ***(em lembrança)***

Rio de Janeiro
2013

Ficha Catalográfica

Rodrigues, Andréa dos Santos.

Estudo para Viabilidade do Desenvolvimento de um Biossensor Microbiano para Metano e Metanol em Combustíveis./ Andréa dos Santos Rodrigues. – 2013.

xviii, 110f. : il; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2013.

Orientadoras: Andréa Medeiros Salgado e Belkis Valdman.

1. Metano. 2. Metanol. 3. Biodiesel. 4. *Methylosinus trichosporium* OB3b. 5. Biossensor. I. Salgado, Andréa Medeiros. II. Valdman, Belkis. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. IV. Título.

ESTUDO PARA VIABILIDADE DO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR MICROBIANO PARA METANO E METANOL EM COMBUSTÍVEIS

ANDRÉA DOS SANTOS RODRIGUES

Proposta de pesquisa de doutorado apresentada ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada por:
ORIENTADORAS

_____
Profª Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Profª Belkis Valdman, Ph.D. (em lembrança)

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Claudinei de Souza Guimarães, D.Sc., Escola de Química - UFRJ

_____
Profª Maria Alice Gomes A. Lima, D.Sc., Departamento de Eng. Química - UFPE

_____
Prof. Paulo Rubens G. Barrocas, Ph.D., ENSP – Fundação Instituto Oswaldo Cruz

_____
Profª. Priscilla Filomena F. Amaral, DSc., Escola de Química - UFRJ

_____
Profª. Rossana Odette Mattos Folly, DSc., Escola de Química - UFRJ

Rio de Janeiro, 2013.

Dedico esta tese à pessoa mais generosa e incentivadora que conheço, aquela que sempre me fez acreditar que tudo pode dar certo, desde que tenhamos perseverança, mesmo quando tudo parece estar errado...

A você, professora Andréa Medeiros Salgado, obrigada por tudo. Não existem palavras que consigam expressar minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a vida e por me permitir estar aqui.

À minha amada filha Maria Eduarda. São tantos os momentos de alegria, de descobertas, de noites mal dormidas também, mas todos os momentos são únicos, e eu só tenho que agradecer a Deus esse lindo presente que tem me feito aprender, crescer e tem me tornado mais completa. E tudo isto é só o começo.

Ao meu marido Eduardo, meu grande amigo. Meu eterno agradecimento pela paciência e ajuda nos momentos conturbados e por ser um pai presente e amoroso.

Aos meus amorosos pais, Candido e Dalva, obrigada por sempre me apoiarem e estarem do meu lado em todos os momentos.

Aos meus demais familiares por estarem do meu lado me dando palavras de incentivo e torcendo por mim.

A Profª Andréa Medeiros Salgado por sua paciência, dedicação e disposição constantes em todos os momentos que precisei de sua orientação.

As queridas alunas de Iniciação Científica Lais e Marina, muito amigas e profissionais, sempre se mostraram muito dispostas a me ajudar. Devo muito a vocês por este momento.

Aos meus amigos do Instituto de Criminalística Carlos Éboli, em especial a Denise Bitencourt, por partilharem todos os momentos conflitantes dentro e fora do Serviço de Perícias de Química.

A minha amiga Verônica Ferreira, sempre disposta em ajudar.

Aos demais amigos do laboratório de Sensores Biológicos da Escola de Química da UFRJ, obrigada pelo incentivo.

Por fim, ao longo de todo o processo que levou à realização desta tese, tive a sorte e o privilégio de ter convivido com pessoas realmente fantásticas, pessoas que me apoiaram em todos os sentidos, que me deram palavras de incentivo e fé, pessoas das quais nunca vou me esquecer. Todas as palavras que aqui dedico não serão suficientes para descrever o quanto privilegiada me sinto por tê-las em minha vida.

RESUMO

RODRIGUES, Andréa dos Santos. Estudo para Viabilidade do Desenvolvimento de um Biossensor Microbiano para Metano e Metanol em Combustíveis. Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A detecção e a quantificação de metano e de metanol, respectivamente, no gás natural e no biodiesel, são realizadas através do emprego das normas técnicas da ASTM e ABNT, sendo a Cromatografia Gasosa a técnica empregada. Avanços no ramo da biotecnologia vêm promovendo o emprego de micro-organismos na elaboração de sistemas analíticos inovadores e, nesse contexto, destacam-se os biossensores. Na natureza, há um grupo de bactérias conhecidas como metanotróficas que possuem habilidade de oxidar compostos contendo um único átomo de carbono, como o metano e metanol, como fonte de crescimento e energia. Estes micro-organismos ao oxidarem microbiologicamente metano e/ou metanol produzem dióxido de carbono como produto final da biodegradação destes. Desta forma, a integração entre bactérias metanotróficas e um sensor de dióxido de carbono consistiria em um sistema analítico inovador, denominado biossensor microbiano, para a análise de metano e de metanol em combustíveis. Neste estudo, ensaios em batelada, envolvendo o emprego de bactérias *Methylosinus trichosporium* OB3b para diferentes concentrações de inóculo e diferentes concentrações de metano e de metanol foram avaliadas em temperatura de 30ºC e valores de pH 6.5 e 5.0. Para concentrações de inóculo específicas e em pH 5.0, ensaios contendo diferentes concentrações de biodiesel no meio de cultivo também foram avaliadas e indicaram que, mesmo em condições adversas, *Methylosinus trichosporium* OB3b foi capaz de se reproduzir. Este fato não ocorreu quando *Methylosinus trichosporium* OB3b foi inoculado com gás natural. Através de medidas efetuadas com um sensor de dióxido de carbono, foi possível verificar as condições nas quais o eletrodo foi capaz de detectar a quantidade de dióxido carbono produzida, sendo as condições de Xo = 0,055 g/L e de Xo = 0,110 g/L, concentração de biodiesel a 50% (v/v) e pH 5.0, aquelas onde mudanças do potencial elétrico, medido pelo sensor de CO_2, foram

exclusivamente percebidas. Análises por cromatografia gasosa no biodiesel utilizado nos ensaios indicaram que o biossensor microbiano proposto não foi eficaz na medição indireta de metanol, sendo este, portanto, inadequado para utilização como método analítico de quantificação de metanol em biodiesel.

Palavras-chave: Metano. Metanol. Biodiesel. *Methylosinus trichosporium* OB3b. Biossensor.

ABSTRACT

RODRIGUES, Andréa dos Santos. Estudo para Viabilidade do Desenvolvimento de um Biossensor Microbiano para Metano e Metanol em Combustíveis. Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Detection and quantification of methane and methanol, respectively, in natural gas and biodiesel, are performed through Gas Chromatography according to ASTM and ABNT technical standards. Advances in biotechnology have been promoting the use of microorganisms in the manufacture of innovative analytical systems, including biosensors. In nature, there are a group of methanotrophic bacteria that posses the ability to oxidize compounds containing a single carbon atom, such as methane and methanol, as a source of growth and energy. These microorganisms oxidize microbiologically one-carbon compounds to carbon dioxide. Thus, the integration of methanotrophic bacteria to a carbon dioxide sensor would consist a new analytical system, called microbial biosensor, for analysis of methane and methanol in fuels. In this study, batch assays involving the use of *Methylosinus trichosporium* OB3b bacteria for different initial inoculum concentrations and different concentrations of methane and methanol were evaluated at 30ºC at pH 6.5 and 5.0. For specific inoculum concentrations and pH 5.0, assays were performed for different concentrations of biodiesel in culture medium. These tests indicate that, even under adverse conditions, *Methylosinus trichosporium* OB3b was able to reproduce. This did not occur when *Methylosinus trichosporium* OB3b was inoculated with natural gas. Through measurements performed with a carbon dioxide sensor was possible to verify the conditions in which the electrode was capable of detecting the carbon dioxide produced, and for the conditions Xo = 0.055 g/L and Xo = 0.110 g/L, biodiesel concentration of 50% (v/v) and pH 5.0, where the conditions where changes in electrical potential measured by CO2 sensor were noticed exclusively. Analysis by gas chromatography in the biodiesel used in the assays indicated that the microbial biosensor proposed was not effective in indirect methanol measurement, which is therefore not suitable for use as an analytical method for quantifying methanol in biodiesel.

Keywords: Methane. Methanol. Biodiesel. *Methylosinus trichosporium* OB3b. Biosensor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1: Gás natural associado (Fonte: MOREIRA, 2007) 8

Figura 3.2: Gás natural não-associado (Fonte: MOREIRA, 2007) 8

Figura 3.3: Transesterificação de triglicerídeos para obtenção de Biodiesel. 13

Figura 3.4: Rota Metabólica de metanotróficos. (JIANG et al., 2010) 19

Figura 3.5: Diagrama Esquemático de um Biossensor (Fonte: SOARES, 2011) 25

Figura 3.6: Princípio de um biossensor microbiano baseado na atividade respiratória (Adaptado de RIEDEL et al., 1992) 28

Figura 3.7: Princípio de um biossensor microbiano baseado na atividade metabólica (Adaptado de RIEDEL et al., 1992) 29

Figura 3.8: Sensor de gás 36

Figura 4.1: Cultura de Methylosinus trichosporium OB3b crescida em meio sólido. 41

Figura 4.2: Sistema contendo meio MSN, micro-organismo e metanol 42

Figura 4.3: Preparo do pré-inóculo 43

Figura 4.4: Preparo do Inóculo 45

Figura 4.5: Eletrodo de CO_2 modelo 95-02, Thermo Orion 51

Figura 4.6: Eletrodo de CO_2 modelo HI 4105, Hanna Instruments. 51

Figura 4.7: Esquema das etapas de calibração dos eletrodos de CO_2. 53

Figura 4.8: Esquema do procedimento das leituras de CO_2 formado pela biodegradação de metano e de metanol. 55

Figura 5.1: Curvas de crescimento de M. trichosporium OB3b em meio líquido MSN e na presença de metanol 57

Figura 5.2: Correlação entre densidade óptica e concentração celular (substrato metano) 58

Figura 5.3: Correlação entre densidade óptica e concentração celular 59

Figura 5.4: Crescimento Celular para X_o= 0,025 g/L e diferentes concentrações de metanol (pH = 6.5; T = 30ºC) 60

Figura 5.5: Crescimento Celular para X_o= 0,075 g/L e diferentes concentrações de metanol (pH = 6.5; T = 30ºC) 61

Figura 5.6: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e 40 mL de metano (pH = 6.5; T = 30ºC) 63

Figura 5.7: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e 40 mL de metano (pH = 6.5; T = 30ºC) 64

Figura 5.8: Crescimento Celular para Xo= 0,055 g/L e diferentes concentrações de metanol (pH = 6.5; T = 30ºC) 66

Figura 5.8.a: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e metanol a 0,5% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC) 67

Figura 5.8.b: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e metanol a 1,0% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC) 67

Figura 5.8.c: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e metanol a 1,3% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC) 68

Figura 5.9: Crescimento Celular para X_o= 0,200 g/L e diferentes concentrações de metanol (pH = 6.5; T = 30ºC) 68

Figura 5.9.a: Crescimento Celular para X_o= 0,200 g/L e metanol a 0,5% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC) 69

Figura 5.9.b: Crescimento Celular para X_o= 0,200 g/L e metanol a 1.0% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC) 69

Figura 5.9.c: Crescimento Celular para X_o= 0,200 g/L e metanol a 1.3% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC) 70

Figura 5.10: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e metanol a 0,5 % (v/v) e a 1.3% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC) 70

Figura 5.11: Crescimento Celular para X_o= 0,228 g/L e metanol a 1.3% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC) 71

Figura 5.12: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e metanol a 1.3% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 72

Figura 5.13: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e metanol a 0.25 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 73

Figura 5.14: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e metanol a 0.25 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 73

Figura 5.15: Rota de biodegradação de metanol por *Methylosinus trichosporium* OB3b (Adaptado de Cornish *et al*., 1984) 74

Figura 5.15: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L; metanol a 0.25 % (v/v) e biodiesel a 0.25% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 76

Figura 5.16: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L; metanol a 0.25 % (v/v) e biodiesel a 50% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 77

Figura 5.17: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e biodiesel a 50% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 78

Figura 5.18: Curva de Calibração do Eletrodo de Dióxido de Carbono. 80

Figura 5.19: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e metanol a 0.25 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 82

Figura 5.20: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e biodiesel a 50 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 83

Figura 5.21: Relação entre as concentrações de biomassa e de dióxido de carbono (X_o= 0,110 g/L; biodiesel a 50 % (v/v); pH = 5.0; T = 30ºC) 85

Figura 5.22: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e metanol a 0.25% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 86

Figura 5.23: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e biodiesel a 50% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 87

Figura 5.24: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e biodiesel a 40% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 87

Figura 5.25: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e biodiesel a 20% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 88

Figura 5.26: Relação entre as concentrações de biomassa e de dióxido de carbono (X_o= 0,055 g/L; biodiesel a 50 % (v/v); pH = 5.0; T = 30ºC) 90

Figura 5.27: Cromatograma Gás Natural 91

Figura 5.28: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e 40 mL de Gás Natural (pH = 6.5; T = 30ºC) 92

Figura 5.29: Cromatograma do Biodiesel Original 94

Figura 5.30: Cromatograma da amostra A 94

Figura 5.31: Cromatograma da amostra B 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Algumas especificações do gás natural – Resolução ANP nº16/2008 11

Tabela 3.2: Comparativo entre os processos de transesterificação pela rotas metílicas e etílicas para produção de biodiesel. 14

Tabela 3.3: Algumas especificações do biodiesel B100- Resolução nº7/2008 15

Tabela 3.4: Metodologias de ensaio para determinação de metano em gás natural e de metanol em biodiesel. 17

Tabela 3.5: Reações de oxidação de substratos orgânicos por *M. trichosporium* OB3b 23

Tabela 3.6: Componentes de um biossensor 27

Tabela 3.7: Algumas publicações envolvendo biossensores microbianos amperométricos. 30

Tabela 3.7: Algumas publicações envolvendo biossensores microbianos potenciométricos e condutimétricos. 31

Tabela 3.9: Sensores de gás usados em biossensores. 37

Tabela 4.1: Composição do meio de cultura MSN (Rodrigues, 2005) 40

Tabela 4.2: Composição do meio sólido de manutenção de *M. trichosporium* OB3b 41

Tabela 4.3: Condições de ensaio para metano como substrato (T= 30°C) 46

Tabela 4.4: Condições de ensaio para metanol como substrato (T= 30°C) 47

Tabela 4.5: Condições de ensaio em meio contendo metanol e biodiesel (T= 30°C) 49

Tabela 4.9: Parâmetros de funcionalidade dos cromatógrafos 56

Tabela 5.1: Valores de ΔX, Δt_{lag}, Δt_{exp} e μ_X para diferentes concentrações celulares iniciais de inóculo (T = 30°C; pH = 6,5; 40 mL de metano; t = 72 h) 64

Tabela 5.2: Taxa específica de crescimento para metanol como substrato. 75

Tabela 5.3: Potencial elétrico e concentração de CO_2 obtida para Xo = 0,110 g/L e biodiesel a 50 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 85

Tabela 5.4: Potencial elétrico e concentração de CO_2 obtida para Xo = 0,055 g/L e biodiesel a 50 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC) 89

Tabela 5.5: Análise por Cromatografia Gasosa do Biodiesel residual (Xo = 0,055 g/L e biodiesel a 50% (v/v)) 95

Tabela 5.6: Teor de metanol obtido pela técnica de cromatografia gasosa 96

Tabela 5.7: Comparativo entre as metodologias analíticas 96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorvância
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASTM	*AmericanSociety for Testingand Materials*
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
DO_{600}	Densidade óptica a 600 nm
MMO	Metano mono-oxigenase
pMMO	Metano mono-oxigenase particulada
sMMO	Metano mono-oxigenase solúvel
MSN	Meio salino nitrato
Xo	Concentração inicial de inóculo
%(v/v)	Concentração volume/volume
μ_X	Taxa Específica de Crescimento

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 GÁS NATURAL E BIODIESEL: CONTEXTUALIZAÇÃO ENERGÉTICA	6
3.1.1 Gás Natural	7
3.1.2 Biodiesel	12
3.2 Fundamentação para uma Nova Metodologia Analítica para Metano e Metanol, respectivamente, em Gás Natural e em Biodiesel	16
3.3 Micro-organismos Metilotróficos e Metanotróficos	18
3.3.1Bactérias *Methylosinus trichosporium* OB3b	22
3.4 BIOSSENSSORES	24
3.4.1 Componentes dos Biossensores	26
3.4.2 Biossensores Microbianos	27
3.4.3 Biossensores Eletroquímicos	31
3.4.4 Biossensores na Análise de Combustíveis	32
3.5 Analitos de Interesse: Metano e Metanol	32
3.5.1 Metano	32
3.5.2 Metanol	34
3.6 Pontenciometria e Eletrodos Sensores a Gás	35
CAPÍTULO 4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Micro-organismo utilizado	38
4.2 Reagentes e Analitos	38
4.3 Equipamentos	39
4.4 Meio de Cultura	39
4.5 Meio de Manutenção	40
4.6 Estudo Inicial do Perfil de Crescimento de *Methylosinus trichosporium* OB3b em Metanol	41
4.7 Pré-inóculo	42

4.8 Determinação da Relação entre Densidade Óptica e Concentração Celular 44

4.9 Preparo do Inóculo 44

4.10 Estudo de Identificação da Fase Exponencial de Crescimento 45

4.11 Condições de Cultivo Celular 45

4.11.1 Cultivo na Presença de Metano 46

4.11.2 Cultivo na Presença de Metanol 46

4.11.3 Cultivo na Presença de Biodiesel 48

4.11.4 Cultivo na Presença de Gás Natural 49

4.12 Método de Detecção de CO_2 como Medida de Biodegradação de Metano e Metanol 50

4.12.1 Obtenção da Curva de Calibração dos Eletrodos Comerciais de CO_2 50

4.12.2 Procedimento para as Análises da Biodegradação de Metano e de Metanol 54

4.13 Análise Cromatográfica 56

Capítulo 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57

5.1 Estudo Inicial do Perfil de Crescimento de *Methylosinus trichosporium* OB3b em Metanol 57

5.2 Relação Densidade Óptica e Concentração Celular 58

5.3 Identificação da Fase Exponencial de Crescimento para Cultivo Celular em Metanol 59

5.4 Ensaios Envolvendo Diferentes Condições de Cultivo Celular 62

5.4.1 Cultivo Celular na Presença de Metano 63

5.4.2 Cultivo Celular na Presença de Metanol 65

5.4.3 Cultivo Celular na Presença de Biodiesel 75

5.5 Curva de Calibração do Eletrodo 79

5.6 Medidas envolvendo o Biossensor Microbiano: Analito de Interesse Metanol 80

5.6.1 Resultados para concentração inicial de inóculo de 0,110 g/L 82

5.6.2 Resultados para concentração inicial de inóculo de 0,055 g/L 86

5.7 Medidas envolvendo o Biossensor Microbiano: Analito de Interesse Metano 90

5.8 Análise Cromatográfica do Biodiesel Utilizado nos Ensaios de Biodegradação 93

5.8.1 Determinação do Consumo de Metanol 95
CAPÍTULO 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES 99
6.1 Conclusões 99
6.2 Sugestões 100
Referências Bibliográficas 101

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A energia tem sido, através da história, a base do desenvolvimento das civilizações. Nos dias atuais, são cada vez maiores as necessidades energéticas para a produção de alimentos, bens de consumo, bens de serviço e de produção, lazer, e finalmente para promover o desenvolvimento econômico, social e cultural. É assim, evidente a importância da energia não só no contexto das grandes nações industrializadas, mas principalmente naquelas em via de desenvolvimento, cujas necessidades energéticas são ainda mais dramáticas e prementes.

O cenário energético mundial vem passando por grandes mudanças nos últimos tempos. O começo do século inicia com uma revolução energética condicionada por fatores como a proximidade do "pico do petróleo" (desnível entre o volume de seu consumo e a descoberta de novas reservas), as incertezas e a ameaça crescente à paz decorrentes da geopolítica explosiva do petróleo e a busca, embora tardia, de uma política rigorosa de redução do consumo das energias fósseis para evitar mudanças climáticas deletérias e irreversíveis, causadas pela emissão excessiva de gases de efeito estufa (SACHS, 2007). Assim, a necessidade da busca por fontes de energia econômica e ecologicamente mais viáveis tem estimulado o emprego crescente de novos combustíveis, dentre os quais se destacam o Gás Natural e o Biodiesel.

Paralelamente a essa mudança no cenário energético, tecnologias novas de análise devem surgir para garantir a qualidade e a confiabilidade de novos insumos energéticos e, conseqüentemente, sustentar o emprego destes no mercado mundial.

Nas últimas duas décadas, o potencial analítico dos biossensores foi reconhecido. Estes são dispositivos analíticos que possuem um componente biológico conectado ou integrado a um sistema físico-químico de transdução. Tais instrumentos apresentam a capacidade de combinar a especificidade do componente biológico ao analito de interesse com a sensibilidade de um

transdutor capaz de converter o sinal da reação entre o componente biológico e o analito alvo em um sinal mensurável e proporcional à concentração do analito. Uma evidência clara da importância dos biossensores está apoiada no interesse da comunidade científica expressada através do grande número de patentes, revisões e publicações (BOSSI *et al*., 2000; ARYA *et al*., 2008; CONROY *et al*., 2009). A viabilidade de aplicação desta metodologia analítica está apoiada em critérios definidos de acordo com protocolos estabelecidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Estes critérios incluem características de calibração (sensibilidade, faixa de concentração linear e operacional, limites de determinação e de detecção quantitativos), seletividade, tempo de resposta, injeção da amostra, reprodutibilidade, estabilidade e tempo de vida (THEVENOT, 2001).

No campo dos métodos analíticos empregados para a detecção e quantificação de metano em Gás Natural e de metanol em Biodiesel, as orientações da Agência Nacional de Petróleo (ANP) indicam que a determinação das características do Biodiesel e do Gás Natural deve ser feita mediante o emprego das normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais "American Society for Testing and Materials" (ASTM), da "International Organization for Standardization" (ISO) e do "Comité Européen de Normalisation" (CEN), sendo a Cromatografia em Fase Gasosa a metodologia analítica utilizada para a quantificação de metano e de metanol nessas matrizes. Esta técnica, embora eficiente, é uma técnica laboriosa e que exige mão de obra especializada na operação dos equipamentos.

Resultados preliminares obtidos através de estudos de biodegradação de metano e de metanol por bactérias *Methylosinus trichosporium* OB3b, realizados em trabalhos prévios, mostraram a viabilidade do emprego dessas bactérias na detecção de metano e metanol (BEST e HIGGINS, 1981; DORONINA *et al*., 2008; HANSON e HANSON, 1996; RODRIGUES, A. S., 2005; XING *et al*., 2006; WHITTENBURY *et al*., 1970; YU *et al*., 2009; DUAN *et al*, 2011). Portanto, o emprego de bactérias metilotróficas *Methylosinus trichosporium* OB3b, integrado a um sistema físico-químico de transdução para

a construção de um biossensor constituiria, assim, um método analítico inovador para a detecção e quantificação de metano e/ou metanol em Gás Natural e Biodiesel, uma vez que não é reportado na literatura científica nenhum sistema analítico semelhante ao proposto no desenvolvimento desta tese.

Para a exposição do trabalho desenvolvido, essa tese foi dividida nos seguintes capítulos:

- Capítulo I (*Introdução*): capítulo que descreve o panorama geral do assunto a ser abordado;
- Capítulo II (*Objetivos*): apresenta os objetivos gerais e específicos relacionados à elaboração dos ensaios desenvolvidos no estudo;
- Capitulo III (*Revisão Bibliográfica*): apresenta o embasamento teórico no qual foi utilizado como suporte técnico ao desenvolvimento do trabalho;
- Capítulo IV (*Material e Métodos*): abrange a descrição de toda a metodologia experimental empregada para a obtenção dos objetivos propostos;
- Capítulo V (*Resultados e Discussão*): aborda todos os resultados obtidos no capítulo III e uma análise, em paralelo, destes resultados;
- Capítulo VI (*Conclusões e Sugestões*): agrupa as considerações obtidas neste trabalho e propõe sugestões para trabalhos futuros na linha de pesquisa em questão.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Esta tese teve como objetivo geral desenvolver um sistema analítico inovador, denominado biossensor microbiano, capaz de detectar e de quantificar metano e metanol, respectivamente, em amostras de Gás Natural e Biodiesel.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de crescimento celular de *Methylosinus trichosporium* OB3b sob diferentes concentrações iniciais de inóculo e diferentes concentrações de metanol sob temperatura e pH específicos;

- Verificar a possibilidade de adaptação do micro-organismo à mudança do pH do meio de cultivo em condições definidas de concentrações iniciais de inóculo e de metanol, sob temperatura definida.

- Estudar a possibilidade de adaptação de *Methylosinus trichosporium* OB3b em um cultivo em batelada constituído pelo meio de cultura e pequena concentração em volume de biodiesel, sob temperatura e pH específicos;

- Realizar cultivos em batelada contendo biodiesel em concentrações variadas de forma a verificar se o micro-organismo é capaz de crescer em condições contendo menor concentração do meio de cultura original;

- Avaliar o perfil de crescimento de *Methylosinus trichosporium* OB3b em presença de Gás Natural ;

- Quantificar o dióxido de carbono gerado através da degradação microbiológica do metano e do metanol, em amostras reais, contendo biodiesel ou gás natural, com o auxílio do sensor de CO_2, caracterizando a utilização do biossensor proposto;

- Comparar os resultados obtidos com o biossensor proposto com método analítico de cromatografia gasosa, o teor de metanol existente na amostra de biodiesel empregada nos testes de biodegradação, e de metano presente no gás natural.

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 GÁS NATURAL E BIODIESEL: CONTEXTUALIZAÇÃO ENERGÉTICA

A história da humanidade é também uma história de descobertas de novas fontes, novas transformações e novas aplicações de energia. O seu desenvolvimento, desde as primeiras civilizações, sempre esteve intimamente relacionado com o domínio de diversas formas de energia, iniciando-se na pré-história com a descoberta do fogo.

No século XVIII, na Inglaterra, a chamada Revolução Industrial marcou o início da era dos combustíveis de origem fóssil. O carvão mineral foi o primeiro desses combustíveis utilizado em grande escala, ao substituir a lenha e ser usado como principal fonte de energia para movimentar as máquinas e as locomotivas a vapor. Essa Revolução Industrial continua até os nossos dias, sempre marcada por novas descobertas no terreno da obtenção e do domínio da energia.

A moderna indústria petrolífera data de meados do século XIX. Tecnicamente oportuno, o petróleo, chamado de “ouro negro”, veio, então, para ficar. Sua elevada densidade energética comparada à do carvão mineral, entre outras características, como a vantagem de ser líquido, portanto mais facilmente transportável, o petróleo passou a ser, não só a fonte de todos os combustíveis líquidos, mas também, a matéria prima de uma grande parte dos produtos ditos modernos (PARENTE, 2003). Estabeleceu-se assim a Era do Petróleo muito importante até os dias atuais.

A crise do petróleo, ocorrida na década de 70, a adoção de uma política de redução do consumo das energias fósseis com vista a conter mudanças deletérias e irreversíveis, causadas pela emissão excessiva de gases de efeito estufa, e a previsão do que alguns geólogos chamam de “pico do petróleo”, que se entende pelo desnível entre o volume de sua produção e o das reservas recém-descobertas, desencadearam a reconsideração da política internacional em relação ao uso do petróleo; uma nova agenda foi aberta pelos países para

discussão sobre fontes alternativas de energia (SACHS, 2007; FARIAS e SELLITO, 2011).

De qualquer forma, nenhuma das transições energéticas do passado se fez por causa do esgotamento físico de uma fonte de energia, mas sim graças à identificação de uma nova fonte de energia com qualidades superiores e custos inferiores. Considerando estas perspectivas, o petróleo ainda se caracteriza por ser a fonte energética de maior expressão. Além disso, nem sempre há equivalência entre o objetivo de maior eficiência energética com o de menor prejuízo ao meio ambiente, uma vez que, com freqüência, o desenvolvimento se sobrepõe ao meio ambiente, sendo tal situação mais agravada com o aumento da população no planeta.

3.1.1 Gás Natural

Até o final da década de oitenta, o gás natural (GN) era visto como um produto de segunda categoria dentre os combustíveis fósseis. Este energético sempre impôs dificuldades e custos adicionais para o seu transporte, armazenamento e distribuição, tornando-se pouco atrativo para os eventuais investidores. Porém, a partir daquela década, seu consumo entrou em franca expansão e o gás natural transformou-se na fonte fóssil de energia a registrar maior crescimento no mundo. Uma posição que detém até hoje e que deverá manter no médio prazo, transformando-se em um energético essencial e estratégico para os países que o utilizam racionalmente (MAZZEI, 2007).

O gás natural é um combustível fóssil resultante da decomposição de matéria orgânica em ambientes com escassez de oxigênio e sob condições elevadas de pressão e temperatura. O gás natural encontrado na natureza consiste quase completamente de metano, CH_4, o hidrocarboneto mais simples. Entretanto, nos reservatórios desse combustível fóssil, o metano é encontrado tipicamente com frações menores de outros hidrocarbonetos mais pesados como o etano, o propano, o butano e o pentano. O gás bruto também contém vapor de água, sulfeto de hidrogênio, gás carbônico e nitrogênio (COADE e COLDHAM, 2006; MOREIRA, 2007; SANTOS *et al*., 2009). A presença e proporção destes componentes dependem fundamentalmente da

localização do reservatório, se em terra ou no mar, sua condição de associado (dissolvido no petróleo ou sob a forma de capa de gás – Figura 3.1) ou não-associado (gás livre ou em presença de petróleo, mas em quantidades muito pequenas – Figura 3.2), do tipo de matéria orgânica ou mistura do qual se originou, da geologia do solo, do tipo de rocha onde se encontra o reservatório, etc. (WILLE, 2005; MOREIRA, 2007).

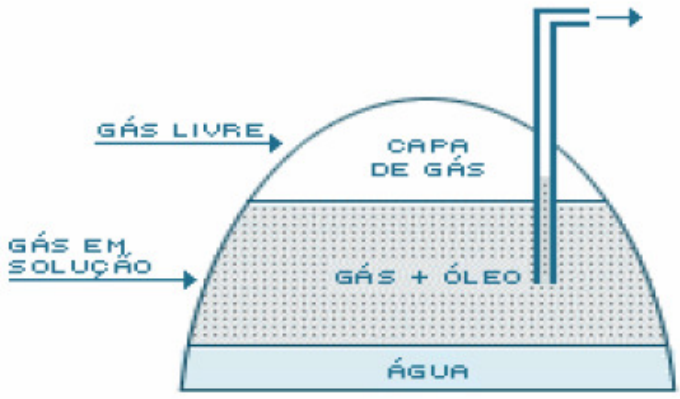

Figura 3.1: Gás natural associado (Fonte: MOREIRA, 2007)

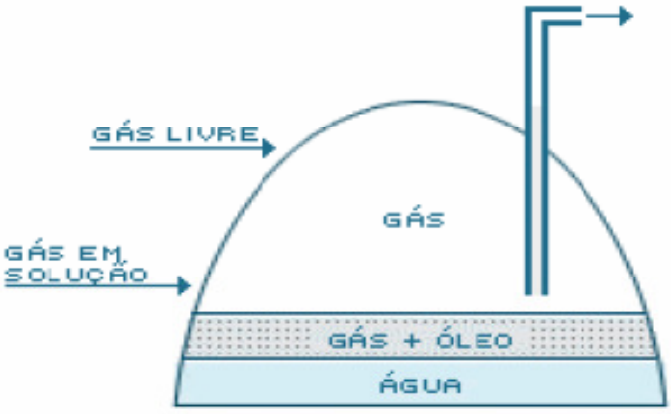

Figura 3.2: Gás natural não-associado (Fonte: MOREIRA, 2007)

O gás natural é um combustível de origem fóssil de grande versatilidade que, após tratamento para a remoção de componentes indesejáveis e processado, pode ser empregado na produção de energia térmica e elétrica.

Por isso, sua aplicação é possível em residências, na indústria, no comércio e na área de transporte, onde mostra qualidades vantajosas quando comparada à gasolina e ao diesel. O gás natural ainda pode ser utilizado como matéria-prima nas indústrias petroquímica, gasquímica e de fertilizantes (MELLO *et al*., 2006; MOREIRA, 2007).

A aplicação do gás natural em um determinado setor depende da sua composição. Por exemplo, um gás natural com teores de propano e de outros hidrocarbonetos mais pesados superiores ao teor do metano é adequado para a utilização em motores de combustão, porém é inadequado para uso veicular, uma vez que o metano apresenta poder antidedonante superior aos demais hidrocarbonetos fertilizantes (MELLO *et al*., 2006; MOREIRA, 2007; MAZZEI, 2007).

O interesse pelo gás natural está diretamente relacionado à busca de alternativas ao petróleo e de fontes menos agressivas ao meio ambiente. Entre as fontes fósseis de energia, o gás natural é o que apresenta menor potencialidade para impactar o meio ambiente, pois seu principal componente, o metano, possui 75% (em massa) de carbono quando comparado aos 86% e 88% nos combustíveis líquidos tradicionais, o que implica numa contribuição menor de CO_2 à natureza proveniente da sua combustão (CAVENATI *et al*., 2006; MAZZEI, 2007; MELLO *et al*., 2006). Seu estado natural gasoso e sua baixa densidade proporcionam uma rápida dissipação na atmosfera sem impregnar organismos minerais, vegetais ou animais. Como é um combustível gasoso, sua combustão se processa da forma mais completa, e a emissão de monóxido de carbono é menor quando comparada a outras fontes fósseis de energia, como a gasolina e o diesel (CAVENATI *et al*., 2006 e MELLO *et al*., 2006).

No Brasil, o órgão responsável por estabelecer padrões de comercialização, distribuição, qualidade e fiscalização de combustíveis é a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Segundo esse órgão, a qualidade dos combustíveis é dada por um conjunto de características físicas e químicas que o definem. Já a especificação dos

combustíveis é formada de valores-limites para essas características, de modo a assegurar o desempenho adequado dos combustíveis.

Em 2002, a ANP, através da Portaria n° 104/2002, e de acordo com as disposições constantes no Regulamento Técnico ANP nº 3/2002 (ANP, 2011), definiu a especificação do gás natural, de origem nacional ou importada, a ser comercializado em todo o território nacional, compreendendo um gás combustível processado que consiste em uma mistura de hidrocarbonetos, principalmente metano, etano, propano e hidrocarbonetos mais pesados em quantidades menores, e estabelece sua especificação para fins industriais, residenciais, comerciais, automotivos e de geração de energia.

Em 2008, uma revisão da Portaria ANP n° 104/2002 foi publicada em forma da Resolução ANP nº 16/2008 de acordo com as disposições descritas no Regulamento Técnico ANP nº 2/2008 (ANP, 2011), o qual disciplina que a determinação das características do produto deverá ser feita mediante o emprego de normas da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), da *International Organization for Standardization* (ISO) e da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). A Tabela 3.1 registra algumas das características que devem ser analisadas segundo as metodologias de ensaio aplicadas à especificação do Gás Natural dentro de normas estabelecidas.

.

Tabela 3.1: Algumas especificações do Gás Natural - Resolução ANP nº 16/2008 (Fonte: anp.gov.br)

CARACTERÍSTICA	**UNIDADE**	**LIMITE**			**MÉTODO**		
		Norte	Nordeste	Centro-Oeste Sudeste e Sul	NBR	ASTM D	ISO
Poder calorífico superior	kJ/ m^3	34.000 a 38.400	35.000 a 43.000		15213	3588	6976
	kWh/m^3	9,47 a 10,67	9,72 a 11,94				
Índice de Wobbe	kJ/m^3	40.500 a 45.000	46.500 a 53.500		15213	--	6976
Número de metano, mín.		anotar	65		--	--	15403
Metano, mín.	**% mol.**	**68**	**85**		**14903**	**1945**	**6974**
Etano, máx.	% mol.	12	12		14903	1945	6974
Propano, máx.	% mol.	3	6		14903	1945	6974
Butanos e mais pesados, max.	% mol.	1,5	3		14903	1945	6974
Oxigênio, máx.	% mol.	0,8	0,5		14903	1945	6974
Inertes (N_2+CO_2), máx.	% mol.	18	8	6	14903	1945	6974
CO_2, máx.	% mol.	3			14903	1945	6974
Gás Sulfídrico (H2S), máx.	mg/m^3	10	13	10	--	5504	6326-3
						6228	

3.1.2 Biodiesel

A partir da década de 90, surgiu uma preocupação mundial em torno do consumo crescente de energia proveniente de fontes fósseis não renováveis. Esse consumo crescente conduziu a um impacto significativo na qualidade do meio ambiente (BLANCO *et al*., 2006; MELLO *et al*., 2006).

Além da problemática ambiental, há também uma preocupação mundial crescente no que se refere à chamada crise mundial do petróleo. Cada vez mais o preço dos derivados de petróleo, como a gasolina e o diesel, tende a subir. A cada ano, o consumo do petróleo aumenta e suas reservas diminuem. Assim, além do problema ambiental, há também o problema político: a cada ameaça de guerra ou crise internacional, o preço do barril de petróleo dispara.

As fontes renováveis de energia têm sido a solução escolhida por diversos países, tanto para minimizar os problemas ambientais como para aumentar a segurança no suprimento de energia, uma vez que elas podem, em muitos casos, substituir as fontes convencionais de origem fóssil. Os benefícios ambientais e as perspectivas de ganhos sociais associadas à contribuição para a redução da importação do óleo diesel têm sido os principais argumentos utilizados para sustentar a idéia da difusão do uso do biodiesel (SANTOS e MATAI, 2008; DERMIBAS, 2009).

De um modo geral, o biodiesel foi definido pela “National Biodiesel Board” dos Estados Unidos como um derivado mono-alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal ou vegetal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores do ciclo Diesel) (COSTA NETO *et al*., 2000; POUSA *et al*., 2007).

O Biodiesel é obtido através de um processo chamado transesterificação (Figura 3.3), no qual ocorre a transformação de moléculas de triglicerídeos, encontradas no óleo, na gordura animal ou vegetal, em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos. Nesse processo, o triglicerídeo empregado reage quimicamente com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador,

normalmente uma base forte, como hidróxido de potássio ou de sódio, para formar para formar ésteres e glicerol (FERRARI, 2005; GERPEN, 2005; GHESTI *et al*., 2012).

Triglicerídeo Álcool Glicerina Ésteres (Biodiesel)

Figura 3.3: Transesterificação de triglicerídeos para obtenção de Biodiesel.

No que tange a escolha do álcool empregado na produção do biodiesel, o metanol tem sido o mais utilizado devido a características relacionadas à sua natureza física e química (cadeia curta e polaridade maior comparada aos demais alcoóis), e também pelo seu baixo preço. Contudo, a aplicação do etanol tem se tornado popular por ser menos tóxico que o metanol. A escolha também depende de fatores econômicos. Nos EUA, a produção de biodiesel a partir do metanol é economicamente viável. No Brasil, contrariamente, o etanol é mais barato e abundante que o metanol. A Tabela 3.2 apresenta um comparativo entre os processos de transesterificação pelas rotas metílicas e etílicas para a produção de biodiesel (SANTOS, 2008; BENEVIDES, 2011)

Existe uma grande variedade de oleaginosas que são potenciais fontes de óleos vegetais para produzir biodiesel. No entanto, existem fatores importantes que devem ser considerados na escolha desta matéria-prima. A relação entre o percentual de óleo da semente e o rendimento por hectare, além do tipo de oleaginosa economicamente disponível na região devem ser considerados na escolha do óleo vegeta. (MARQUES *et al*., 2008).

A grande variedade de técnicas de produção de ésteres graxos juntamente com a diversidade de oleaginosas com potencial para produzir o óleo vegetal, torna o processo de obtenção do biodiesel uma prática com muitas variáveis. A complexidade destas variáveis acarreta em óleos com diferentes características, de modo que a determinação de parâmetros e

normas que definam padrões de qualidade para o biodiesel obtido tornou-se fundamental. Uma alta pureza do biodiesel é imprescindível, pois os contaminantes presentes no produto final podem deteriorar o combustível, depositarem-se no motor e obstruir o filtro (MARQUES *et al*., 2008).

Tabela 3.2: Comparativo entre os processos de transesterificação pelas rotas metílicas e etílicas para a produção de biodiesel (Fontes: SANTOS, 2008; BENEVIDES, 2011).

VANTAGENS	
Metanol	**Etanol**
Consumo de metanol é cerca de 45% menor que do etanol anidro, exigindo menor quantidade.	Se for feito a partir de biomassa, produz um combustível 100% renovável.
Mais reativo.	Não é tóxico.
Melhor purificação dos ésteres metílicos no final do processo.	Maior oferta no Brasil.
Maior facilidade de recuperação do metanol residual por destilação.	Gera mais ocupação e renda no meio rural.
DESVANTAGENS	
Metanol	**Etanol**
Pode ser produzido a partir da biomassa, porém é tradicionalmente um produto fóssil.	Dependendo do preço da matéria-prima, os custos de produção de biodiesel etílico podem ser até 100% maiores que o metílico.
Mais tóxico.	Os ésteres etílicos possuem maior afinidade à glicerina, dificultando a separação.
É mais volátil, apresentando maior risco de incêndios (chama invisível).	Difícil recuperação dos excessos residuais por destilação.

A Lei nº 11.097 de 2005 dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, tornando obrigatória a adição de um percentual mínimo de biodiesel ao diesel fóssil. Ficou determinado que a partir de três anos, a contar da data de publicação da lei, o percentual mínimo de 2% de biodiesel deveria ser adicionado ao diesel de petróleo, formando uma mistura denominada B2. Após oito anos, este percentual deveria aumentar para 5% resultando na mistura B5 (MARQUES *et al*., 2008).

No Brasil, o biodiesel é regulamentado, pela ANP. A determinação das características físico-químicas é feita conforme as normas nacionais NBR da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *International Organization for Standardization* (ISO) e do *Comité Européen de Normalisation* (CEN). A Tabela 3.3 apresenta algumas das especificações do biodiesel B100, segundo a Resolução ANP nº 7/2008 (Anexo), que é exigida para que o produto seja utilizado no mercado brasileiro, com os seus respectivos limites de contaminantes e os métodos que devem ser empregados no seu controle de qualidade.

Tabela 3.3: Algumas Especificações do Biodiesel B100 - Resolução ANP nº 7/2008 (Fonte: anp.gov.br).

CARACTERÍSTICA	**UNIDADE**	**LIMITE**	**MÉTODO**		
			ABNT NBR	**ASTM D**	**EN/ISO**
Massa específica a 20 ºC	kg/m^3	850-900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 - EN ISO 12185
Teor de Água, máx. (2)	mg/kg	500	-	6304	EN ISO 12937
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15342 (4) (5)	-	EN 14103
Resíduo de carbono (6)	% massa	0,050	-	4530	-
Enxofre total, máx.	mg/kg	50	- -	5453	- EN ISO 20846 EN ISO 20884
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448 -	664 -	- EN 14104 (10)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 (5) - -	6584 (10) -	- EN 14105 (10) EN 14106 (10)
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344 (5) -	6584 (10) -	- EN 14105 (10)
Mono, di, triacilglicerol (7)	% massa	Anotar	15342 (5) 15344 (5)	6584 (10)	- - EN 14105 (10)
Metanol ou Etanol, máx.	**% massa**	**0,20**	**15343**	**-**	**EN 14110**

No processo de obtenção do Biodiesel, a quantidade de álcool empregada pode influenciar na qualidade do combustível obtido. Os álcoois mais empregados são o metanol e o etanol. A presença destes em excesso pode influenciar no ponto de fulgor, na lubricidade e na redução do número de cetano (qualidade de ignição) do biodiesel. Outro problema que pode surgir devido ao excesso desses álcoois é a corrosão em peças de alumínio e de zinco (ARAÚJO, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2008). O álcool residual, presente em baixa concentração, é amostrado por *headspace* e quantificado por cromatografia gasosa com uma coluna capilar de fase estacionária metilpolisiloxano ou polietilenoglicol e detector por ionização de chama (FID) (MARQUES *et al*., 2008).

3.2 Fundamentação para uma Nova Metodologia Analítica para Metano e Metanol, respectivamente, em Gás Natural e em Biodiesel

De acordo com os relatos anteriores, com relação à quantificação dos compostos metano e metanol, a análise destes, segundo as resoluções nº 16/2008 (Gás Natural) e nº 7/2008 (Biodiesel) deve ser feita pela técnica de Cromatografia Gasosa (Tabela 3.4).

Avanços na indústria eletrônica e na tecnologia de microprocessadores, bem como na biotecnologia e na bioquímica, tornaram possível nos últimos anos, o desenvolvimento de novas técnicas de preparação de sensores específicos e seletivos denominados biossensores. Estes são instrumentos analíticos que possuem um componente biológico conectado ou integrado a um sistema físico-químico de transdução (BOSSI *et al*., 2000; ARYA *et al*., 2008).

Registros científicos falam sobre a existência de bactérias metilotróficas, dentre elas o micro-organismo *Methylosinus trichosporium* OB3b, que são capazes de oxidar compostos contendo um único átomo de carbono, tais como metano e metanol, a dióxido de carbono (HANSON e HANSON, 1996; SULLIVAN *et al*., 1998; MADIGAN *et al*., 1997; XING *et al.*, 2006; YU *et al*., 2009; JIANG *et al*., 2010; PANT e PANT, 2010; DUAN, 2011). Tal característica observada para essa classe de bactérias torna-se, desta forma, de interesse biotecnológico relevante, uma vez que um biossensor formado por bactérias

metilotróficas *Methylosinus trichosporium* OB3b seria passível para a análise simultânea de metano e metanol.

Tabela 3.4: Metodologias de ensaio para a determinação de metano em Gás Natural e de metanol em Biodiesel.

GÁS NATURAL	
MÉTODO	**TÍTULO**
ASTM D 1945	Metodologia Padrão para Análise de Gás Natural por Cromatografia Gasosa.
ISO 6974	Determinação da Composição do Gás Natural, com incerteza definida, por Cromatografia Gasosa.
ABNT NBR 14903	Determinação da Composição Química por Cromatografia em Fase Gasosa.
BIODIESEL	
MÉTODO	**TÍTULO**
EN 14110	Determinação do Teor de Metanol em Biodiesel por Cromatografia Gasosa.
ABNT NBR 15343	Determinação da Concentração de Metanol e/ou Etanol por Cromatografia Gasosa.

Testes preliminares envolvendo diferentes condições de biodegradação (temperatura, pH, concentração celular e concentração do substrato) de metano por bactérias *Methylosinus trichosporium* OB3b foram realizados (RODRIGUES, 2005.). A quantidade de dióxido de carbono produzido na oxidação do metano pela bactéria foi determinada através de um sensor de CO_2. Os resultados obtidos mostraram a viabilidade do emprego de tais bactérias como componente de sensibilidade biomimética na construção de um biossensor.

Partindo-se dos conhecimentos expostos acima, as bactérias *Methylosinus trichosporium* OB3b poderiam ser empregadas na construção de um biossensor para a detecção de metano e/ou metanol em amostras de combustíveis, tais como o Gás Natural e o Biodiesel.

3.3 Micro-organismos Metilotróficos e Metanotróficos

Muitos micro-organismos desempenham importante papel no ambiente, pois participam dos ciclos biogeoquímicos de transformação de substâncias químicas, sendo responsáveis pela desinfecção e desintoxicação de ambientes poluídos (WATANABE, 2002). Entre estes tipos de micro-organismos encontram-se as bactérias metilotróficas.

As bactérias metilotróficas são capazes de oxidar uma ampla faixa de diferentes compostos que apresentam um único átomo de carbono em estado de oxidação menor que o CO_2, tais como metano, metanol, aminas metiladas, clorometano, bromometano, e compostos metilados contendo enxofre. Tais características apresentadas por estes tipos de bactérias são de interesse biotecnológico significante (HANSON e HANSON, 1996; SULLIVAN *et al*., 1998; MADIGAN *et al*., 1997; XING *et al*., 2006; CHISTOSERDOVA *et al*., 2009; YU *et al*., 2009).

As bactérias metanotróficas, também chamadas bactérias oxidantes de metano, são um subgrupo dos micro-organismos metilotróficos capazes de utilizar metano como fonte exclusiva de carbono celular e de energia (HANSON e HANSON, 1996; MADIGAN *et al*., 1997; LIEBERMAN e ROSENZWEIG, 2004; XING *et al*., 2006; JIANG *et al*., 2010). Estes tipos de bactérias mostram um papel essencial no ciclo global do carbono, pois são responsáveis pela maior parte da oxidação biológica de metano produzido em solos anóxicos e sedimentos, prevenindo, assim, a acumulação de metano na atmosfera (PACHECO-OLIVER *et al*., 2002; AMARAL *et al*., 1995; JIANG *et al*., 2010). Tais bactérias podem ser encontradas em amostras oriundas de lodos, pântanos, rios, arrozais, oceanos, lagos, solos para o plantio, florestas, ribeirões, lodo ativado e em ambientes extremos como fontes termais, tundras ambientes ácidos, alcalinos e termofílicos (HANSON e HANSON, 1996; MURREL e RADAJEWSK, 2000; LIEBERMAN e ROSENZWEIG, 2004; McDONALD *et al*., 2008; JIANG *et al*., 2010).

Na oxidação do metano a dióxido de carbono pelas bactérias metanotróficas (esquematizada na Figura 3.4), há formação de metanol, formaldeído e ácido fórmico como produtos intermediários. O formaldeído gerado é assimilado para a produção de material celular ou para a produção de energia para as células. O caminho utilizado pelas metanotróficas para a assimilação dessa substância depende do gênero de organismo metanotrófico empregado na oxidação do metano (HANSON e HANSON, 1996; LIEBERMAN e ROSENZWEIG, 2004; JIANG *et al.*, 2010).

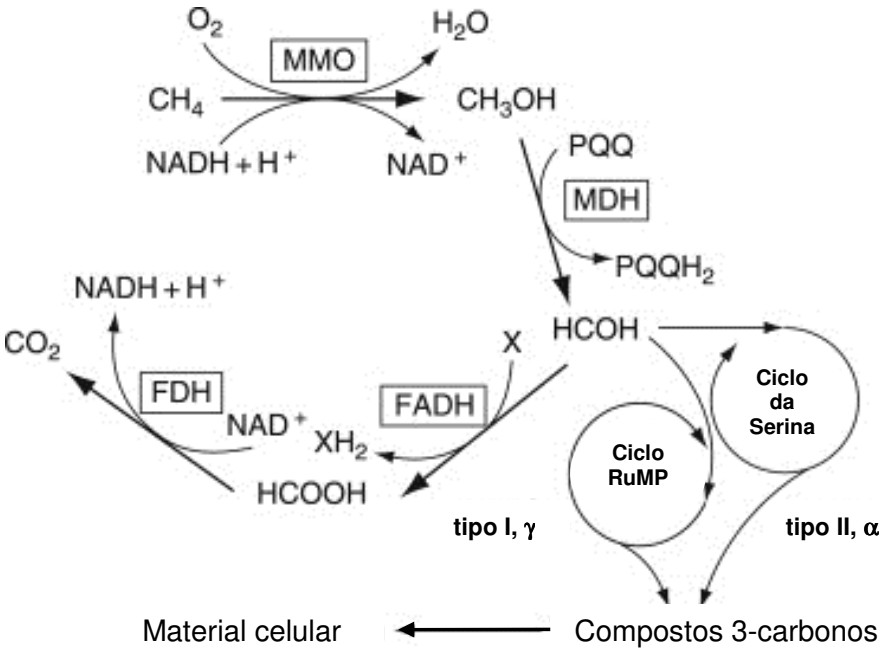

Figura 3.4: Rota Metabólica de metanotróficos (JIANG *et al.*, 2010).

A etapa inicial de oxidação do metano a metanol é catalisada pela enzima metano mono-oxigenase (MMO) e, embora existam pontos ainda obscuros sobre esse mecanismo, de forma geral a oxidação do metano inicia-se com a quebra da ligação O-O do gás oxigênio e da ligação C-H do metano, sendo um dos átomos de oxigênio reduzido para formar água e o outro incorporado ao metano para formar metanol (NICOLAIDIS e SARGENT, 1987; HANSON e HANSON, 1996; JIANG *et al.*, 2010). Na próxima etapa, a enzima

metanol desidrogenase (MDH) catalisa a oxidação do metanol a formaldeído, o qual poderá ser oxidado a CO_2 ou utilizado para a biossíntese de material celular (HANSON e HANSON, 1996; LIEBERMAN e ROSENZWEIG, 2004). Segundo Murrel *et al*. (2000) as reações que convertem formaldeído a CO_2 geram força redutora para a biossíntese de material celular e para a etapa inicial de oxidação.

As bactérias metanotróficas são conhecidas desde o início do século XX, quando, em 1906, o pesquisador Soghngen isolou, a partir de plantas aquáticas, um micro-organismo denominado *Bacillus methanicus*, que utilizava metano como fonte de carbono e energia (ANTONHY, 1982; DALTON, 2005). Entretanto, foi a partir de 1970, com Whittenbury e colaboradores, que as bactérias metanotróficas receberam especial atenção. No estudo realizado por estes pesquisadores, mais de 100 linhagens de bactérias metanotróficas aeróbias, obtidas de ambientes diversos, foram isoladas (ANTONHY, 1982; HANSON e HANSON, 1996; DALTON, 2005).

Até o momento, as bactérias metanotróficas estão separadas em três grupos filogenéticos principais: tipo I (gêneros *Methylomonas* e *Methylobacter*), tipo II (gêneros *Methylosinus* e *Methylocystise*) e tipo X (*Methylococcus capsulatus*). Esta divisão está fundamentada principalmente em diferenças morfológicas, nas estruturas das membranas intracitoplasmáticas, nas vias de assimilação do formaldeído (rota da Serina ou rota da Ribulose Monofosfato), na habilidade de fixar nitrogênio, e em algumas outras características fisiológicas (AMARAL *et al*., 1995; DIANOU e ADACHI, 1999; MADIGAN *et al*., 1997; HANSON e HANSON, 1996; SONDERER, 2007; JIANG *et al*., 2010).

O uso de enzimas conhecidas como metano mono-oxigenases (MMO) que catalisam a oxidação inicial de metano a metanol é uma característica definida das bactérias metanotróficas. Todos os organismos metanotróficos conhecidos são capazes de formar uma enzima particulada ou ligada à membrana (pMMO). Entretanto, a capacidade de formar uma enzima solúvel ou citoplasmática (sMMO) foi observada apenas em algumas espécies de

metanotróficas (BEGONJA e HRSAK, 2001; HANSON e HANSON, 1996; SONDERER, 2007; JIANG *et al*., 2010).

Embora as bactérias metanotróficas sejam o único grupo de micro-organismos possíveis de degradar metano, a enzima metano mono-oxigenase (MMO) é também capaz de oxidar uma variedade de poluentes ambientais, entre eles o tricloroetileno, o dicloroetilieno e o naftaleno. Esta capacidade oxidativa da enzima metano mono-oxigenase faz com que as bactérias metanotróficas sejam empregadas em processos de biorremediação de ambientes contaminados (SPEITEL *et al*., 1993; MARTIN e MURRELL; 1995; NICOLAIDIS e SARGENT, 1987; PACHECO-OLIVER *et al*., 2002; SONDERER, 2007; JIANG *et al*., 2010).

Os dois tipos de enzimas, sMMO e pMMO, não diferem apenas em suas localizações celulares, mas também por suas diferenças em especificidade de substrato, exigências de oxigênio e cobre, sensibilidade a inibidores e exigências de NADH desidrogenase (HANSON e HANSON, 1996; SULLIVAN *et al*., 1998; BEGONJA e HRSAK, 2001).

Grande parte da literatura científica cita a importância do cobre na expressão do tipo de enzima metano mono-oxigenase. Em culturas crescidas em meio onde se tem baixa concentração de cobre, a enzima predominante é a solúvel (sMMO) que contém um sítio ativo de ferro bivalente (BALASUBRAMANIAN e ROSENZWEIG, 2008; JIANG *et al*., 2010). Já em meios com alta de concentração de cobre, a enzima particulada (pMMO) é a que prevalece, a qual contém cobre em sítio ativo (MARTIN e MURREL, 1995; SULLIVAN *et al*., 1998; BEGONJA e HRSAK, 2001; CORNISH *et al*., 1984; HANSON e HANSON, 1996; SONDERER, 2007;).

A forma solúvel da enzima apresenta uma faixa ampla de especificidade de substratos quando comparada à forma particulada. Por exemplo, a enzima sMMO é capaz de oxidar hidrocarbonetos halogenados alifáticos, alicíclicos e compostos aromáticos como, por exemplo, o naftaleno a 1- e 2-naftóis (HANSON e HANSON, 1996; MARTIN e MURREL, 1995; JIANG *et al*., 2010).

Desta forma, a reatividade ímpar e o amplo espectro de substratos das enzimas metano mono-oxigenases indicam diversas aplicações potenciais deste grupo de micro-organismos em processos de biotransformação e biorremediação e ressaltam o potencial uso dos mesmos em aplicações industriais (JIANG *et al*. 2010).

3.3.1 Bactérias *Methylosinus trichosporium* OB3b

Methylosinus trichosporium OB3b, uma bactéria metilotrófica Gram-negativa, foi isolado por WHITTENBURY *et al*. (1970) e classificada como uma bactéria utilizadora de metano do Tipo II baseada em suas estruturas de membrana e pela via da Serina para assimilação do formaldeído (NICOLAIDS e SARGENT, 1987).

As bactérias *M. trichosporium* OB3b possuem tanto a enzima metano mono-oxigenase solúvel (sMMO) quanto a metano mono-oxigenase particulada (pMMO) dependendo das condições de crescimento empregadas. A atividade de pMMO foi encontrada apenas quando o organismo foi crescido em condições onde a quantidade de oxigênio era limitada e em condições de excesso de nitrato, ao passo que, a atividade de sMMO foi encontrada em culturas contínuas esgotadas em nitrato ou em condições de crescimento onde o oxigênio ou o metano eram limitados (CORNISH *et al*., 1984). Outro fator importante na regulação do tipo de enzima é a concentração de cobre. Em condições de crescimento onde há baixas concentrações de cobre, a forma solúvel (sMMO) é o tipo de enzima predominante. Ao passo que, em concentrações mais elevadas de cobre, a forma particulada (pMMO) é a que predomina (HANSON e HANSON, 1996; SPEITEL *et al*., 1993; MARTIN e MURREL, 1995; SULLIVAN *et al*., 1998).

Na literatura científica, grande parte dos estudos envolvendo *M. trichosporium* OB3b está relacionada à característica da enzima metano mono-oxigenase solúvel (sMMO). Entretanto, assim como ocorre com todos os tipos de bactérias metanotróficas, no micro-organismo M. *trichosporium* OB3b, a enzima sMMO apresenta uma faixa de especificidade de substrato mais ampla do que a enzima pMMO (SULLIVAN *et al*., 1998; YU *et al*., 2009). Portanto,

dependendo das condições de crescimento empregadas, como diferentes concentrações de oxigênio e de cobre, a especificidade em relação a um determinado substrato pode ser alterada.

Shimoda e colaboradores (1993a) relataram estudos da oxidação de metano, etano, propano e butano em seus produtos metanol, etanol, 1-propanol e 1-butanol, respectivamente, na presença de ciclopropano que age como inibidor da enzima responsável (enzima MDH, Figura 3.4) pela degradação subseqüente do álcool formado. Alguns relatos mencionaram a oxidação de propanos halogenados, propeno e metano na presença de ciclopropanol como inibidor da enzima MDH (FURUTO *et al.*, 1999; SHIMODA *et al.*, 1993b). Outros estudos relataram a epoxidação de alcenos alifáticos, com até cinco átomos de carbono, ciclo-hexeno e compostos halogenados derivados do propeno (ONO e OKURA, 1990; SEKI *et al.*, 1994). Rodrigues e colaboradores (2009) descreveram o emprego de *Methylosinus trichosporium* OB3b no processo de oxidação de metano comercial em diferentes condições de cultivo em batelada. Em 2010, Jiang e autores fizeram citações em seu artigo do emprego de *M. trichosporium* OB3b em processos de oxidação de compostos orgânicos catalisados pela enzima sMMO (Tabela 3.5).

Tabela 3.5: Reações de oxidação de substratos orgânicos por *M. trichosporium* OB3b (Fonte: Jiang *et al.*, 2010)

Substrato	**Produtos de reação detectados**
Tricloroetileno	Formato; CO; glioxilato; dicloroacetato; cloral
1,1-Dicloroeteno	Glicolato; dicloroacetaldeído
Tribromoetileno	Farmato; bromal
Estireno	Óxido de estireno
Bifenil	2-hidroxibefenil; 3-hidroxibefenil; 4-hidroxibefenil
2-Hidroxibifenil	di-hidroxibifenil
2-Clorobifenil	Hidroxiclorobifenil

3.4 BIOSSENSSORES

Nas últimas duas décadas, o potencial analítico dos biossensores foi reconhecido. Uma evidência clara da importância dos biossensores está apoiada no interesse da comunidade científica expressado através do grande número de patentes, revisões e publicações.

Tendo-se como referência os anos de 1993 a 2011, 64 patentes foram depositadas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e, dentro deste quantitativo, 16% correspondiam a autores brasileiros. Entre os anos de 2002 a 2012, foram registrados no portal Capes 144 artigos na área de biossensores publicados por autores brasileiros (JACOBY e DE PAULA, 2012).

Em anos recentes, os biossensores vêm sendo amplamente avaliados no monitoramento contínuo de processos biológicos e sintéticos e na compreensão destes. Devido à sua simplicidade, alta sensibilidade e habilidade potencial para análises em tempo-real e *on-site*, várias aplicações típicas dos biossensores têm sido realizadas em muitas áreas, tais como análise clínica, controle ambiental, medidas químicas na agricultura, e nas indústrias de alimentos e de drogas (ZANG *et al.*, 2000; DONG e CHEN, 2002; DHAWAN *et al.*, 2009; CONROY *et al.*, 2009).

Um biossensor é descrito como um dispositivo analítico compacto contendo um elemento biológico, ou de sensibilidade biomimética, que está intimamente conectado ou integrado a um sistema físico-químico de transdução. Os elementos biológicos podem ser moléculas biocatalíticas, tais como enzimas e micro-organismos, ou moléculas de afinidade, tais como anticorpos e ácidos nucléicos (DNA ou RNA). Os transdutores físico-químicos podem ser eletroquímicos, ópticos, calorimétricos ou piezoelétricos (VELASCO-GARCIA e MOTTRAM, 2003; HANASHI *et al.*, 2009).

A construção de um biossensor baseia-se na integração complementar de duas partes: o componente biológico ativo e o transdutor. A primeira faz o reconhecimento de uma determinada substância (analito) por meio de uma reação bioquímica específica, gerando, por exemplo, uma variação na

concentração de prótons, a liberação de gases, a emissão ou a absorção de luz, a emissão de calor, uma variação de massa, uma mudança no estado de oxidação do analito, etc; e a segunda, converte a energia destes eventos numa forma mensurável, como uma variação de corrente, potencial, temperatura e outros (ALFAYA e KUBOTA, 2002; LEI *et al.*, 2006; ARYA *et al.*, 2008). A representação esquemática de um biossensor encontra-se na Figura 3.5.

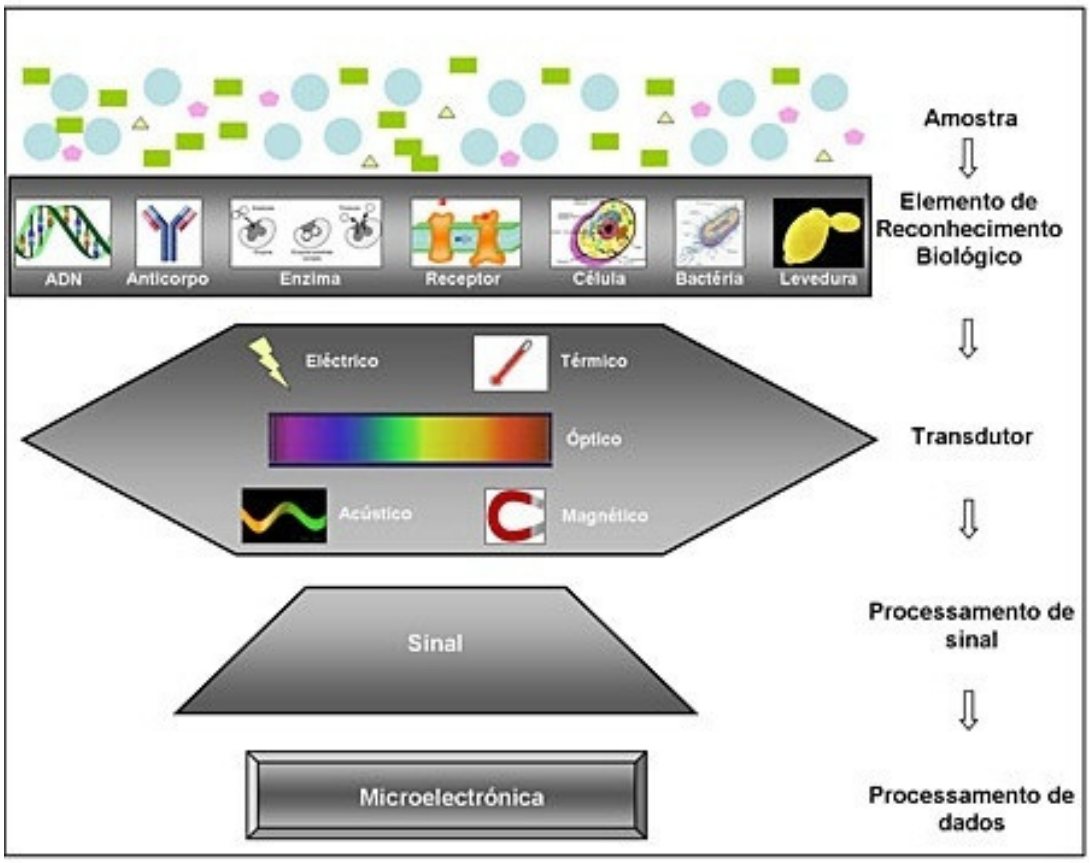

Figura 3.5: Diagrama Esquemático de um Biossensor
(Fonte: SOARES, 2011)

A viabilidade de aplicação dos biossensores está apoiada em critérios definidos de acordo com protocolos estabelecidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Estes critérios incluem características de calibração (sensibilidade, faixa de concentração linear e operacional, limites de determinação e de detecção quantitativos), seletividade, tempo de resposta, injeção da amostra, reprodutibilidade, estabilidade e tempo de vida útil (ROSATTO, 2001; THEVENOT, 2001; MELO, 2012).

3.4.1 Componentes dos Biossensores

Os componentes biológicos de um biossensor não são responsáveis apenas pelo reconhecimento seletivo do analito, mas também pela geração do sinal físico-químico monitorado pelo transdutor e, finalmente, pela sensibilidade final do biossensor (DU *et al*., 2008). Eles podem ser divididos em duas categorias: catalíticos e não-catalíticos. O grupo catalítico compreende enzimas, micro-organismos e tecidos. Dispositivos que são montados com estes elementos são apropriados para a monitoração de metabólitos em concentrações na faixa milimolar e micromolar. O componente biológico do tipo não-catalítico ou sensor por bioafinidade compreende anticorpos (ou antígenos), receptores e ácidos nucléicos, os quais são mais aplicados para a medição de hormônios, esteróides, drogas, toxinas microbianas, marcadores de doenças (antígeno ou anticorpo) e vírus em concentrações na faixa micromolar e picomolar (PADDLE, 1996).

Os transdutores usados na construção de um biossensor podem ser: eletroquímicos (amperoméricos, potenciométricos, condutimétricos) — medem uma mudança na corrente elétrica ou na voltagem; calorimétricos — detectam mudanças de calor que ocorrem em algumas reações bioquímicas; ópticos — medem mudanças de luz absorvida ou emitida como conseqüência de uma reação bioquímica; piezoelétricos ou acústicos — medem mudanças na freqüência de oscilação de um cristal piezolelétrico resultantes de variações de massa que ocorrem na superfície do cristal (GERARD *et al*., 2002; MEHRVAR e ABDI, 2004; MELLO e KUBOTA, 2002).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de componente biológico envolvido no mecanismo ou no modelo do sinal de transdução ou numa combinação desses dois fatores. A escolha do componente biológico e do transdutor adequado depende das propriedades de cada amostra de interesse e do tipo de magnitude física a ser medida (FARRÉ *et al*., 2009; MELLO e KUBOTA, 2002), por este motivo é de fundamental relevância verificar a adequação tanto do componente biológico selecionado, quanto do transdutor às amostras reais a serem quantificadas. A Tabela 3.6

lista os tipos de transdutores disponíveis e os elementos biológicos que podem ser combinados a eles para a formação do biossensor.

Tabela 3.6: Componentes de um biossensor (Fonte: PADDLE, 1996).

Elemento Biológico	Tipo de Transdutor
	Eletroquímico
Enzimas	Potenciométrico
Micro-organismos	Amperométrico
Tecidos de animais e plantas	Condutimétrico
Anticorpos	**Óptico**
Antígenos	Fluorescência
Ácidos nucléicos	Luminescência
Células	Espectrofotométrico
	Ressonância de plasma de superfície
	Acústico
	Calorimétrico

3.4.2 Biossensores Microbianos

As enzimas são os elementos biológicos mais utilizados na fabricação dos biossensores. Embora enzimas purificadas tenham elevada especificidade para os seus substratos ou inibidores, a sua aplicação na construção de biossensores pode ser limitada pela etapa de purificação onerosa e demorada ou pela exigência de várias enzimas para gerarem produto mensurável ou pela necessidade de cofator/coenzima (LEI *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2011). Os micro-organismos proporcionam uma alternativa ideal para estes problemas. As muitas enzimas e co-fatores que co-existem nas células dão aos micro-organismos a capacidade de consumir e, portanto, detectar um grande número de analitos; no entanto, isso pode comprometer a seletividade. Os micro-

organismos podem ser manipulados e adaptados para consumirem e degradarem novo substrato sob certas condições de cultivo. Além disso, o progresso em biologia molecular abriu inúmeras possibilidades de adequar os micro-organismos para melhor desempenharem sua atividade celular. Todas estas características fazem dos micro-organismos excelentes elementos de sensibilidade biomimética (LEI *et al.*, 2006).

Os biossensores que utilizam células íntegras como elemento biológico de reconhecimento, chamados comumente de biossensores microbiológicos ou sensores microbianos, são constituídos por micro-organismos tais como: bactérias, leveduras e fungos filamentosos, integrados a um sistema de transdução adequado. Nestes sensores, a assimilação do analito (substrato) pelo micro-organismo provoca uma mudança na atividade respiratória do micro-organismo (Figura 3.6) ou produz metabólitos eletroativos, tais como CO_2, NH_3 e H^+, que são monitorados diretamente pelo transdutor (Figura 3.7).

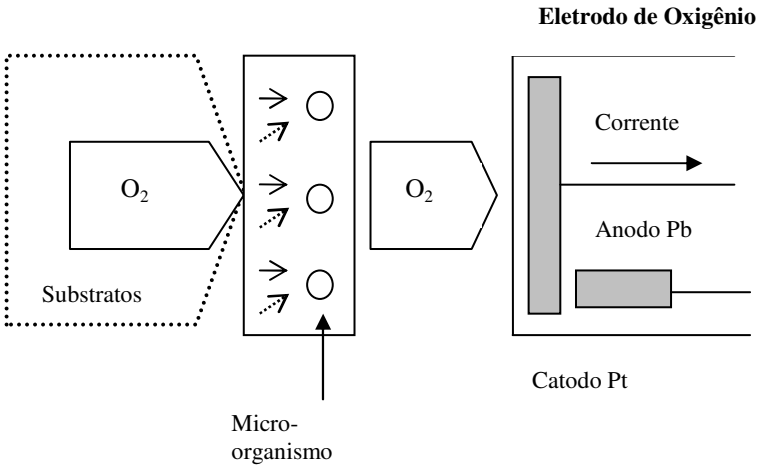

Figura 3.6: Princípio de um biossensor microbiano baseado na atividade respiratória (Adaptado de RIEDEL *et al.*, 1992).

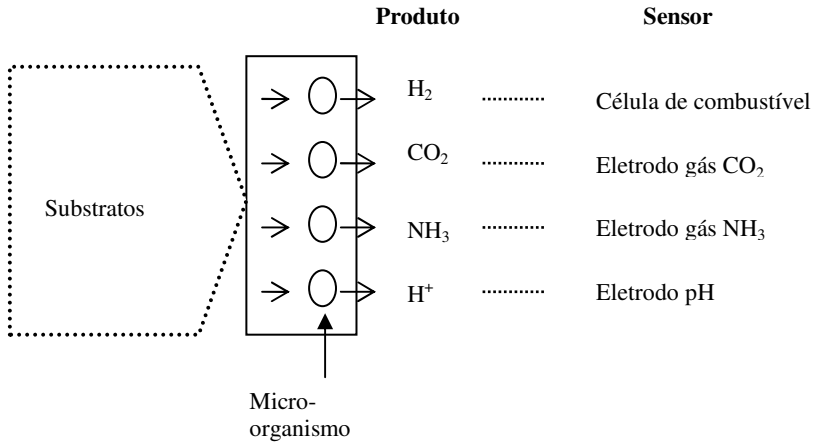

Figura 3.7: Princípio de um biossensor microbiano baseado na atividade metabólica (Adaptado de RIEDEL *et al*., 1992).

Outras vantagens do emprego de micro-organismos em vez de enzimas purificadas é que os micro-organismos podem ser facilmente isolados da natureza (rios, sedimentos, solo, etc.). Além disso, biossensores microbiológicos são menos sensíveis à inibição por outros compostos presentes na matriz, são mais tolerantes a variações de pH e temperatura, uma vez que os componentes biológicos se encontram no ambiente intracelular que é controlado internamente por mecanismos celulares, e geralmente têm maior tempo de vida útil. Por essas características, há um grande número de trabalhos científicos reportando a utilização dos biossensores microbianos, principalmente no monitoramento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e de metais pesados (ROSATTO, *et al*., 2001; BARROCAS *et al*., 2008).

Entretanto, algumas limitações inerentes aos sensores microbianos são os tempos de resposta mais longos e menor seletividade do que a obtida com enzimas isoladas, devido à variedade de processos metabólicos ocorrendo em uma célula viva (ROSATTO, *et al*., 2001). Outra limitação no uso de células íntegras é a difusão de substrato e produtos através da parede celular resultando numa baixa resposta quando comparado aos sensores baseados em enzimas. Uma das formas de evitar este problema é utilizar células permeabilizadas. As células podem ser permeabilizadas usando técnicas

físicas, químicas e enzimáticas (D'SOUZA, 2001). As Tabelas 3.7 e 3.8 registram algumas publicações científicas relacionadas ao emprego de biossensores microbianos amperométricos e outros biossensores microbianos eletroquímicos.

Tabela 3.7: Algumas publicações envolvendo biossensores microbianos amperométricos (Fonte: SU *et al*., 2011).

Analito	**Micro-organismo**	**Sensor**	**Modo de detecção**
Paraoxon	*Pseudomonas putida*	Eletrodo oxigênio Clark	Batelada
Paration	*Pseudomonas putida*	Eletrodo oxigênio Clark	Batelada
p-Nitrofenol	*Pseudomonas sp.*	Eletrodo oxigênio	Batelada
Fe^{2+}	*Acidithiobacillus ferrooxidans*	Eletrodo oxigênio	Batelada
Etanol	*Candida tropicalis*	Eletrodo de oxigênio dissolvido	Batelada
L-lisina	*Sacaromices cerevisae*	Eletrodo de oxigênio dissolvido	Batelada
Metano	*Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella SP.*	Eletrodo de oxigênio dissolvido	Batelada
Tolueno	*Pseudomonas putida*	Eletrodo de oxigênio dissolvido	FIA

Tabela 3.8: Algumas publicações envolvendo biossensores microbianos potenciométricos e condutimétricos (Fonte: SU *et al.*, 2011).

Analito	Micro-organismo	Sensor	Tipo de Sensor
Penincilina	*Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*	Eletrodo de CO_2	Potenciométrico
Cefalosporina	*Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*	Eletrodo de CO_2	Potenciométrico
Cefalosporina	*Pseudomonas aeruginosa*	Eletrodo de pH	Potenciométrico
Cd^{2+}	*Chlorella vulgaris*	Eletrodo de Pt	Condutimétrico

3.4.3 Biossensores Eletroquímicos

Os biossensores também podem ser nomeados baseando-se no tipo de propriedade físico-química medida, assim podem ser denominados biossensores eletroquímicos, biossensores ópticos, biossensores piezoelétricos e calorimétricos. Destes, os biossensores eletroquímicos são os mais comuns talvez devido à sua grande versatilidade e, de acordo com o princípio de detecção, podem ser divididos em amperométricos, potenciométricos, voltamétricos e em células de combustível microbianas (MFC – *microbial fuel cells)* (SU *et al.*, 2011). Dentre estes, os biossensores amperométricos e os potenciométricos são os que possuem o maior número de registros na literatura científica.

Os biossensores amperométricos medem a corrente elétrica gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo. O sinal resultante da corrente elétrica gerada é correlacionado à concentração do analito de interesse. O eletrodo de oxigênio possui grande aplicação como transdutor na construção de biossensores amperométricos (SU *et al.*, 2011)..

Os biossensores potenciométricos medem a variação do potencial num sistema que segue a equação de Nernst. Tal variação é correlacionada à concentração do analito de interesse. O transdutor utilizado em biossensores potenciométricos é geralmente um eletrodo de detecção de gás ou um eletrodo seletivo a um íon específico (CONROY *et al*., 2009; SU *et al*., 2011).

3.4.4 Biossensores na Análise de Combustíveis

Em se tratando da aplicação de biossensores como método analítico para o controle de qualidade de combustíveis, a literatura científica é ainda escassa em relação à pesquisa desenvolvida neste tema.

Alguns trabalhos publicados (Katrlík *et al*., 2006; GORIUSHKINA *et al*., 2009) relataram sobre o desenvolvimento de biossensores para a análise de glicerol, um sub-produto obtido no processo de obtenção de biodiesel, mas não objetivaram a aplicação desses sensores para a análise da qualidade do biodiesel. Recentemente, Melo (2012) desenvolveu um biossensor eletroquímico potenciométrico utilizando lipase como elemento biológico para utilização como instrumento para verificação da qualidade do biodiesel.

Trabalhos como “Development and Application of an Integrated System for Monitoring Ethanol Content of Fuels” (ALHADEFF *et al*., 2004) e “Integrated Biosensor Systems for Ethanol Analysis” (ALHADEFF *et al*., 2008) são alguns que comentam sobre a importância do controle de qualidade do etanol para fins automotivos.

3.5 Analitos de Interesse: Metano e Metanol

3.5.1 Metano

O metano é um dos gases traços atmosféricos que é participativo em reações fotoquímicas que ocorrem na atmosfera e que apresenta uma grande capacidade de absorção de radiação infravermelha emitida pela superfície do planeta (WHALEN, 2005; WUEBBLES e HAYHOE, 2002). Ele é produzido por bactérias metanogênicas sob condições anaeróbias e consumido por bactérias

oxidantes de metano (bactérias metanotróficas) em ambientes aeróbios (WHALEN, 2005; TOHJIMA e WAKITA, 1994). Além disso, é um gás de efeito estufa cuja concentração atmosférica vem aumentando significativamente. Conseqüentemente, o estudo detalhado das transformações do metano em ecossistemas naturais e antropogênicos (relacionados à atividade humana) é de grande interesse (DAMGAARD *et al.*, 1998).

O metano é emitido na atmosfera a partir de uma variedade de fontes, que podem ser de origem relacionada à ação humana, chamadas fontes antropogênicas ou antrópicas, como também de origem natural.

As fontes antropogênicas de metano incluem atividades relacionadas ao uso de combustíveis fósseis – principalmente o gás natural –, à decomposição da matéria orgânica em aterros sanitários – formação do biogás –, a práticas relacionadas à agricultura e à queima da biomassa (WUEBBLES e HAYHOE, 2002; LAWRENCE, 2006).

O metano é um importante intermediário do ciclo do carbono na natureza. É o contribuinte mais importante para o efeito estufa efeito depois do CO_2, sendo aproximadamente 23 vezes mais eficaz como um gás de efeito estufa do que o CO_2 (DALTON, 2005; WEN *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2010).

A remoção de metano da atmosfera, ou seja, a sua conversão em produtos menos perigosos, pode ocorrer através de processos químicos e biológicos. Uma grande parte do metano é oxidada na camada mais inferior da atmosfera, a troposfera, através reações de fotodissociação entre o ozônio troposférico e o vapor d'água. Esta oxidação representa cerca de 90% dos mecanismos de remoção do metano (WUEBBLES e HAYHOE, 2002; JIANG *et al.*, 2010).

O restante do metano ou é transportado à estratosfera, camada atmosférica situada acima da troposfera, ou é removido por oxidação microbiológica através de determinados tipos de bactérias existentes no solo, dentre elas as bactérias metanotróficas (WUEBBLES e HAYHOE, 2002; JIANG *et al.*, 2010). A importância dessa classe de bactérias foi relatada no item 3.3.

Em relação à produção científica de biossensores para metano, há um número limitado de publicações. Em 1997, Damgaard e Revsbech desenvolveram um biossensor composto por bactéria metanotrófica e por um sensor amperométrico de oxigênio. Neste trabalho, a resposta do biossensor foi influenciada pela presença dos interferentes sulfeto de hidrogênio e de oxigênio, o qual era injetado através de um capilar no sistema bioanalítico para facilitar a reação de oxidação microbiológica do metano. Em 1998, Damgaard e demais autores fizeram adaptações neste mesmo biossensor com o objetivo de eliminar tais interferentes (Lawrence, 2006). Em 2008, Wen e pesquisadores elaboraram um sistema bioanalítico contendo dois micro-organismos, *Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella sp.*, imobilizados numa espécie de rede localizada dentro do sistema bioanalítico próximos a um sensor de oxigênio dissolvido. O que existe de comum entre estas pesquisas é o fato de que nenhuma delas utilizou um sensor potenciométrico como transdutor.

3.5.2 Metanol

O metanol, cuja fórmula molecular é CH_3OH, é um líquido incolor que possui um odor suave em temperatura ambiente. Desde sua descoberta, no final do século XVII, o metanol vem sendo uma das matérias-primas mais consumidas na indústria química. Já foi também chamado de álcool de madeira, devido a sua obtenção comercial a partir da destilação destrutiva da madeira (PEREIRA e ANDRADE, 1998).

Os principais usos do metanol encontram-se na produção de formaldeído, metil tert-butil éter (MTBE), um aditivo para gasolina, e como combustível puro ou em mistura com gasolina para veículos leves (PEREIRA e ANDRADE, 1998).

Há também um grande número de trabalhos científicos que reportam a utilização do metanol em Células de Combustível, conhecidas pela sigla DMFC (Direct Methanol Fuel Cells ou Células a Combustível de Metanol Direto). Tais dispositivos apresentam, entre alguns atributos, a facilidade de miniaturização, operação à temperatura ambiente e eficiência na conversão da energia química em elétrica (CHANG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007; CHEN e ZHAO, 2007). A

grande barreira que atualmente há de ser vencida tem a ver com o custo ainda elevado desta tecnologia, do preço dos materiais e dos processos de fabricação, o que tem restringido o uso da tecnologia das células de combustível.

Dentro do paradigma das questões energética e ambiental, o metanol pode ser empregado na produção do biodiesel, um combustível que tem atraído considerável atenção devido aos seus benefícios ambientais e ao fato de poder ser obtido através de fontes alternativas de energia, como óleos vegetais e gorduras animais (FERRARI *et al*., 2005; MARCHETTI *et al*., 2005; ARAÚJO *et al*., 2008; DUAN *et al*., 2011).

Há poucos registros científicos sobre a utilização de biossensores para detecção de metanol, podendo ser citados como exemplos o emprego de um biossensor amperométrico bienzimático, formado pelas enzimas álcool oxidase e álcool desidrogenase, para análise de bebidas supostamente falsificadas (BUCUR *et al*., 2008), o monitoramento de metanol em fase orgânica com um biossensor formado pela enzimas álcool oxidase e peroxidase e horseradish peroxidase (WU *et al*., 2007) e a detecção de metanol com um biossensor amperométrico contendo a enzima metanol desidrogenase (LUI e KIRCHHOFF, 2007), mas nenhum envolve a aplicação de micro-organismo como componente biológico.

3.6 Pontenciometria e Eletrodos Sensores a Gás

A potenciometria é uma das metodologias eletroanalíticas mais conhecidas e difundidas em Química Analítica. Sua base foi estabelecida por Nernst, em 1888 e seu princípio está fundamentado na medida do potencial eletroquímico, ou seja, na diferença de potencial entre dois eletrodos, o eletrodo indicador e o eletrodo de referência, em uma célula eletroquímica, em condições onde a corrente é considerada desprezível. As medidas potenciométricas são feitas, geralmente, por eletrodos íon-seletivos (SILVA, 2012).

A análise potenciométrica tem sido aplicada nas mais diversas áreas, tais como controle químico de águas e alimentos, amostras biológicas (sangue,

soro, urina, saliva, etc), produtos farmacêuticos, assim como na área ambiental. Aplicações mais recentes: determinação de concentração de espécies iônicas (medidas diretas com eletrodos), pH e gases dissolvidos (SKOOG, 2005).

Eletrodos sensores de gases (Figura 3.8) formam uma classe de eletrodos íon seletivos consistindo de um tubo contendo um eletrodo de referência, um eletrodo seletivo a íons (geralmente um eletrodo sensível à variação de pH) e uma solução de um eletrólito que fica dentro do tubo. Uma membrana fina, permeável a gases, fica encaixada na extremidade do tubo e serve de barreira entre as soluções interna e do analito (SKOOG, 2005).

Substâncias gasosas ao se difundirem através da membrana alteram a composição da solução interna através da mudança da concentração do íon principal. Esta mudança é detectada e mensurada pelo par de eletrodos imersos na solução interna (SKOOG, 2005).

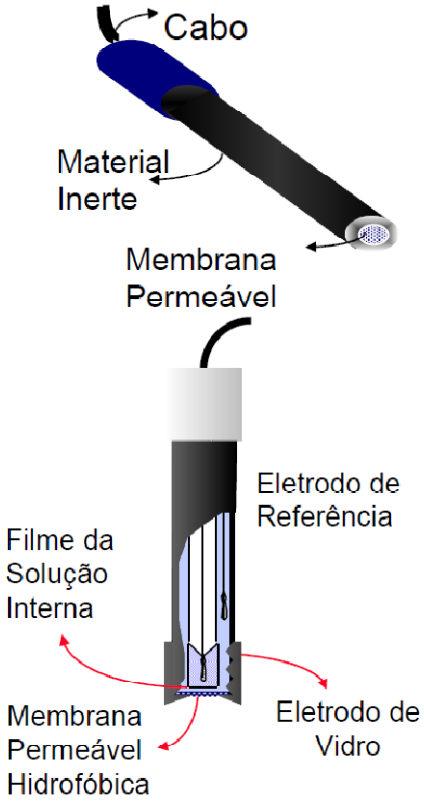

Figura 3.8: Sensor de gás

Entre os sensores de gases mais utilizados na construção de biossensores encontram-se os eletrodos de dióxido de carbono e de amônia. A Tabela 3.9 registra alguns exemplos de biossensores configurados com estes tipos de sensores.

Tabela 3.9: Sensores de gás usados em biossensores.

Substrato	**Biocomponente**	**Transdutor**	**Referência**
Uréia	*Canavalia ensiformis* (urease)	Sensor NH_3	Silva, 2012.
Cefalosporina (β-lactâmico)	*Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*	Sensor de CO_2	Ferrini *et al.*, 2008
Quinolonas e tetraciclinas	*Escherichia coli*	Sensor CO_2	Pellegrini *et al.*, 2004.
Piruvato	*Streptococcus faecium*	Sensor CO_2	Di Paolantonio e Rechnitz, 1983.
Tirosina	*A. phenologenes*	Sensor NH_3	
L-aspartato	L-aspartase	Sensor NH_3	Fatibello-Filho *et al.*, 1989

CAPÍTULO 4: MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo teve como objetivo descrever as metodologias experimentais empregadas na condução de todos os ensaios realizados para a elaboração desta tese, bem como informar os reagentes e equipamentos utilizados.

Muitos dos ensaios conduzidos foram baseados em estudo preliminar realizado durante o desenvolvimento da dissertação de Mestrado “Estudos de Biodegradação de Metano por *Methylosinus trichosporium* OB3b para Uso Potencial em Biossensor” (Rodrigues, 2005).

4.1 Micro-organismo utilizado

A bactéria metilotrófica *Methylosinus trichosporium* OB3b, empregada em todo o trabalho, foi adquirida através de doação do **Biotechnology Research Institute**, Canadá. Os protocolos de crescimento celular, do meio de manutenção e da obtenção da relação entre absorvância e concentração de células são descritos nos itens que se seguem.

4.2 Reagentes e Analitos

Todos os reagentes utilizados na preparação do meio de cultura e do meio de manutenção foram adquiridos da Vetec Química Fina Ind. e Com. Ltda (Brasil).

O gás metano empregado nos testes foi o Metano grau 2.5, com pureza de 99.5%, fornecido pela White Martins Gases Industriais Ltda.

Amostras de biodiesel metílico de soja, com teor de metanol de 0,145% (m/m), foram gentilmente cedidas pelo Professor Donato Aranda (Laboratório de Tecnologia Verde – GreenTec – Centro de Tecnologia, Escola de Química, UFRJ).

O gás natural utilizado foi doado pelo Laboratório de Análises de Gases (LABAG) da Divisão de Metrologia Química (DQUIM) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (Xerém, RJ).

4.3 Equipamentos

- Analisador de Umidade por Infravermelho, modelo IV 2000 (*Gehaka)*;
- Balança Analítica, modelo ED 224S (*Sartorius*);
- Centrífuga, modelo Q222T (*Quimis*);
- Eletrodo íon seletivo combinado de dióxido de carbono, modelo HI 4105 (*Hanna Instruments*);
- Eletrodo íon seletivo de dióxido de carbono, modelo 95-02 (*Thermo Orion*)
- Espectrofotômetro Visível Digital Microprocessado, modelo Q798DRM (*Quimis*);
- Incubadora Shaker Orbital de Bancada, modelo CT 712R (*Cientec*);
- pHmetro Microprocessado, modelo Q400MT (*Quimis*);
- Cromatógrafo a Gás Micro-CG 4900 (*VARIAN*)
- Cromatógrafo a Gás GC-2010 (*SHIMADZU*)

4.4 Meio de Cultura

Um meio salino nitrato (MSN), formulado por CORNISH *et al*. (1984) e utilizado em trabalho preliminar (RODRIGUES, 2005), foi usado para a obtenção do pré-inóculo e para os testes experimentais realizados. A composição desse meio é apresentada na Tabela 4.1.

Para a obtenção da concentração das espécies constituintes do meio MSN, soluções estoque concentradas foram inicialmente preparadas e, posteriormente, diluídas e esterilizadas em autoclave.

Tabela 4.1: Composição do meio de cultura MSN.

Solução	Componente(s)	Concentração (g/L de meio)
A	$NaNO_3$	0,85
B	KH_2PO_4	0,53
	Na_2HPO_4	0,86
C	K_2SO_4	0,174
	$MgSO_4.7H_2O$	0,037
	$CaCl_2.2H_2O$	0,007
D	$ZnSO_4.7H_2O$	$5,74.10^{-4}$
	$MnSO_4.4H_2O$	$4,46.10^{-4}$
	H_3BO_3	$1,24.10^{-4}$
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	$9,6.10^{-5}$
	$CoCl_2.6H_2O$	$9,6.10^{-5}$
	KI	$1,66.10^{-4}$
	H_2SO_4 (1 mM)	(2 μM)
E	$FeSO_4.7H_2O$	$1,12.10^{-2}$
F	$CuSO_4.5H_2O$	$2,5.10^{-4}$

4.5 Meio de Manutenção

Para a manutenção celular, realizada em placas de petri e em tubos de ensaio, a cultura de *M. trichosporium* OB3b foi mantida em meio sólido constituído pelo meio inorgânico MSN contendo 3% (p/v) de Agar-agar e 1,3 % (v/v) de metanol P.A.. A composição desse meio de manutenção encontra-se registrada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Composição do meio sólido de manutenção de *M. trichosporium* OB3b.

Componentes	Quantidade
Meio MSN	100 mL
Agar-agar	3g
Metanol	1,3 mL

Após o crescimento da cultura no meio de manutenção à temperatura ambiente, esta (Figura 4.1) foi armazenada em geladeira a 4°C. A cada três meses, foram realizados repiques do meio de manutenção.

Figura 4.1: Cultura de *Methylosinus trichosporium* OB3b crescida em meio sólido.

Os meios utilizados foram esterilizados em autoclave, à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm por 20 minutos.

4.6 Estudo Inicial do Perfil de Crescimento de *Methylosinus trichosporium* OB3b em Metanol

Um estudo inicial da cinética de biodegradação de metanol P.A. por *Methylosinus trichosporium* OB3b foi realizado a fim de se conhecer o perfil de crescimento bacteriano utilizando este analito. Desta forma, 50 mL de meio

MSN (item 4.4) e 0,650 mL de metanol, contidos em erlenmeyers de 250 mL, previamente esterilizados, foram inoculados com colônia de *M. trichosporium* OB3b estocada em meio de manutenção (item 4.5). Decorrido um prazo de vinte e quatro horas, diferentes volumes, 3 mL e 6 mL, da suspensão celular obtida, foram transferidos para erlenmeyers distintos de 250 mL contendo 0,650 mL de metanol e um volume de meio MSN suficiente para se obter um volume final de 50 mL. Os erlenmeyers foram vedados com rolhas de borracha (Figura 4.2) e deixados sob agitação de 150 rpm em shaker e à temperatura de 30ºC.

Figura 4.2: Sistema contendo meio MSN, micro-organismo e metanol.

O acompanhamento do perfil de crescimento celular foi realizado através da leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}). Para este fim, alíquotas de 3,0 mL do meio foram colhidas, com auxílio de seringas, no tempo zero e a cada seis horas até que a DO_{600} atingisse um valor máximo indicando o alcance da fase estacionária.

4.7 Pré-inóculo

A obtenção do pré-inóculo, usado nos experimentos de crescimento celular, foi feita com o objetivo de obter uma suspensão celular contendo o micro-organismo em condições de plena atividade celular, ou seja, na fase exponencial de crescimento. Para esse fim, dois erlenmeyers de 150 mL,

contendo 25 mL de meio MSN (item 4.4) e 0,325 mL de metanol, foram inoculados com colônia de *Methylosinus trichosporium* OB3b estocada em meio de manutenção (item 4.5). Estes erlenmeyers foram colocados em incubadora shaker de bancada com controle de temperatura de 30ºC e sob agitação de 150 rpm durante 48 horas. Decorrido esse tempo, o conteúdo de cada um destes erlenmeyers foi transferido a dois erlenmeyers de 250 mL. A estes últimos, foram adicionados mais 25 mL de meio MSN, 0,650 mL de metanol, de forma a manter a mesma proporção existente nos erlenmeyers de 150 mL, e inoculados com colônia de *Methylosinus trichosporium* OB3b. Por fim, estes erlenmeyers de 250 mL foram deixados sob as mesmas condições de agitação e temperatura mencionadas anteriormente, entretanto durante um período de 24 horas (Figura 4.3). O pré-inóculo assim preparado foi empregado nos ensaios tanto para metanol quanto para o metano.

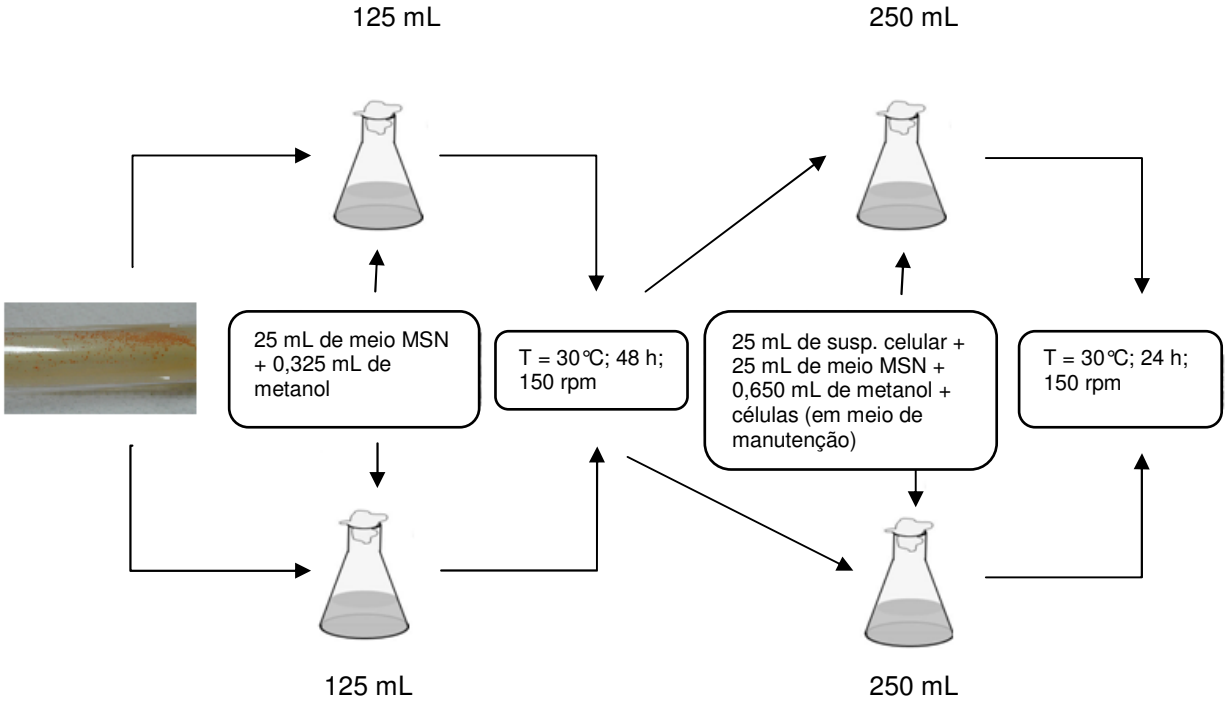

Figura 4.3: Preparo do pré-inóculo.

4.8 Determinação da Relação entre Densidade Óptica e Concentração Celular

Com a finalidade de estabelecer uma relação entre a concentração celular e os valores de densidade óptica (absorvância), medidos no comprimento de onda de 600 nm, foi utilizado o método convencional de determinação do peso seco de células (biomassa seca).

Ao final do crescimento celular realizado até a obtenção da fase estacionária, as células foram centrifugadas por 25 minutos a 3500 rpm e o precipitado obtido foi ressuspenso em volume conhecido de meio MSN. Uma fração determinada desse volume foi filtrada em membrana de acetato de celulose (porosidade 0,22 μm e diâmetro de 47 mm). A biomassa contida na membrana foi secada e medida em analisador de umidade por infravermelho. Para o cálculo da concentração de células em g/L, o valor medido da massa celular foi dividido pelo volume utilizado na filtragem da suspensão celular.

Com o restante da suspensão celular, foram preparadas seis diluições diferentes, e alíquotas de cada uma destas soluções foram colhidas e levadas ao espectrofotômetro para a leitura das densidades ópticas a 600nm. Cada leitura foi correlacionada a uma determinada concentração celular calculada através do valor obtido na etapa da determinação do peso seco de células.

Esta metodologia de determinação da relação entre concentração celular e densidade óptica foi empregada para os cultivos em metanol e em metano.

4.9 Preparo do Inóculo

Esta etapa foi realizada com a finalidade de se alcançar as concentrações de inóculo a serem empregadas em todos os ensaios de biodegradação. Após o preparo do pré-inóculo (item 4.7), a absorvância da suspensão celular obtida foi determinada em espectrofotômetro, a 600 nm, e a concentração de células foi determinada através da relação obtida no item 4.8. Um volume conhecido da suspensão celular foi centrifugado de forma estéril, a 3500 rpm, durante 20 minutos. A biomassa obtida foi separada do sobrenadante e ressuspensa em 10 mL de meio MSN obtendo, assim, um

concentrado de células que foi empregado como inóculo de partida para os ensaios realizados (Figura 4.4).

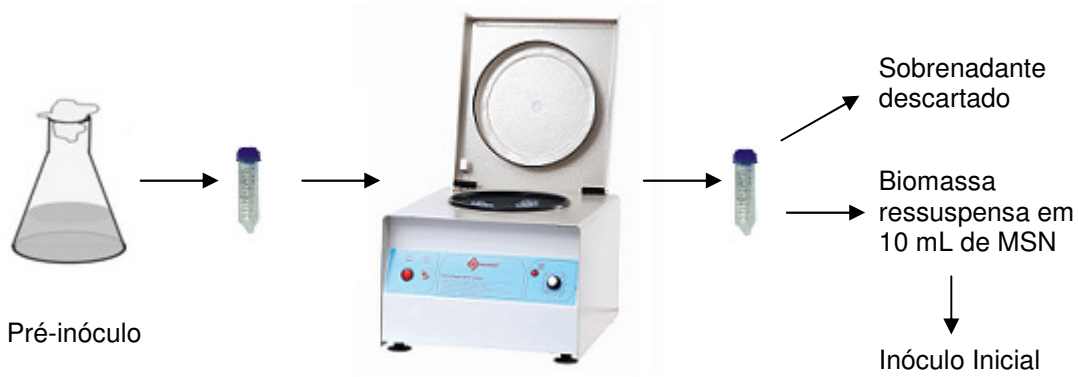

Figura 4.4: Esquema de Preparo do Inóculo

4.10 Estudo de Identificação da Fase Exponencial de Crescimento

Após o procedimento de obtenção do pré-inóculo (item 4.7) e do inóculo (item 4.9), foram realizados cultivos celulares partindo-se de concentrações iniciais de inóculo de 0,025 g/L e 0,075 g/L e concentrações de metanol de 0,7% (v/v) e 1,3% (v/v), para temperatura controlada de 30°C e pH 6.5, com o intuito de identificar a partir de qual momento a fase exponencial de crescimento seria alcançada partindo-se da utilização de um concentrado de células obtido no preparo do inóculo (item 4.9). Todos os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL deixados sob agitação de 150 rpm em shaker orbital, sendo o perfil de crescimento acompanhado através das medidas de absorvância no comprimento de onda de 600 nm até a obtenção da fase estacionária.

4.11 Condições de Cultivo Celular

As etapas a seguir relatam os procedimentos adotados para o conhecimento do perfil de crescimento celular na presença de metano e de metanol, numa primeira fase. De posse das observações obtidas a partir

desses ensaios, passou-se ao estudo do cultivo com amostras reais de biodiesel e de gás natural.

4.11.1 Cultivo na Presença de Metano

Visando dar continuidade a trabalhos anteriores efetuados por Rodrigues (2005), nesta etapa foram realizados experimentos para condições definidas de temperatura, pH, volume de metano e diferentes concentrações iniciais de inóculo (Tabela 4.3). Assim, alíquotas conhecidas da suspensão celular de *M. trichosporium* OB3b, preparada conforme o item 4.9, foram transferidas para erlenmeyers de 250 mL contendo meio MSN. O volume ocupado por estes foi de 50 mL. Antes da adição de gás metano, os erlenmeyers foram vedados com rolhas de borracha e selados com fita teflon para garantir que não ocorresse perda de metano para o exterior. A injeção de metano foi realizada com auxílio de seringa, mantendo os erlenmeyers invertidos, diretamente na fase líquida. Após estes procedimentos, os erlenmeyers foram deixados sob agitação a 150 rpm em shaker orbital, sob temperatura controlada de 30°C. O acompanhamento do perfil do crescimento celular foi realizado através da leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}), sendo a primeira leitura no tempo inicial (0h) e as demais a cada seis horas.

Tabela 4.3: Condições de ensaio para metano como substrato (T =30ºC).

Condição	Concentração de inóculo (g/L)	Volume de metano (mL)	Concentração de metano (ppm)	pH
G1	0,055	40	143,4	6,5
G2	0,110	40	143,4	6,5

4.11.2 Cultivo na Presença de Metanol

Tendo-se como objetivo a otimização da biodegradação de metanol por *Methylosinus trichosporium* OB3b, procurou-se conhecer as melhores

condições de consumo deste substrato pela bactéria e o crescimento desta a partir de diferentes concentrações iniciais do micro-organismo e de metanol.

Nessa etapa de estudo, o cultivo de *Methylosinus trichosporium* OB3b foi realizado em erlenmeyers de 250 mL contendo o meio MSN, metanol e o concentrado de células preparado conforme descrito no item 4.9, estes sempre ocupavam 20% do volume total (50 mL) dos erlenmeyers, os quais foram deixados sob agitação, em shaker orbital, a 150 rpm e sob temperatura controlada de 30ºC. O acompanhamento do perfil do crescimento celular *de M. trichosporium* OB3b foi realizado através da leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}), sendo a primeira leitura no tempo inicial (0h), a segunda, após 12 horas de cultivo, e as demais leituras foram realizadas em intervalos de uma hora.

Os valores de concentração de inóculo, concentração de metanol e de pH testados encontram-se sumarizados na Tabela 4.4. Cada condição experimental foi realizada em triplicata.

Tabela 4.4: Condições de ensaio para metanol como substrato (T =30ºC)

Condição	**Concentração de inóculo (g/L)**	**Concentração de metanol (v/v)**	**pH**
L1	0,055	0.5% 1.0% 1.3%	6,5
L2	0,200	0.5% 1.0% 1.3%	6,5
L3	0,110	1.3%	6,5
L4	0,228	1.3%	6,5
L5	0,110	0.25% 1.3%	5,0
L6	0,055	0.25%	5,0

Os testes descritos nas condições L1, L2, L3 e L4 foram realizados sem que o pH do meio de cultura (pH = 6.5) fosse alterado. Para as condições L5 e L6, o pH foi modificado para 5.0, utilizando solução de HCl 0,1 molar. A alteração foi assim feita em virtude do uso futuro do sensor de dióxido de carbono, o qual necessita, para sua operação, que as medidas sejam efetuadas para valores de pH variando entre 4.8 e 5.2.

Além disso, uma quarta concentração de metanol (0.25% v/v), mais diluída que as empregadas nas quatro primeiras condições, foi avaliada levando-se em consideração a etapa posterior de utilização de amostras de biodiesel que, de acordo com a Resolução ANP nº07 de 2008, devem apresentar um conteúdo de metanol não excedente a 0.20% (m/m) (LÔBO *et al.*, 2009).

4.11.3 Cultivo na Presença de Biodiesel

Na condução dos ensaios envolvendo o biodiesel, o primeiro objetivo foi o de verificar se a sua presença no meio de cultura interferiria no crescimento da bactéria. Para isso, o cultivo de *Methylosinus trichosporium* OB3b foi realizado em erlenmeyers de 250 mL contendo o meio MSN, metanol, na concentração de 0.25% (v/v), e biodiesel na concentração de 0.25% (v/v) para a concentração de inóculo de 0,055 g/L e valor de pH 5.0. Numa segunda etapa, o cultivo foi realizado em erlenmeyers de 500 mL contendo o meio MSN e biodiesel em concentrações de 50% (v/v), 40% (v/v) e 20% (v/v), sem a presença de metanol no meio, para concentrações iniciais de inóculo de 0,055 g/L e de 0,110 g/L (para esta concentração, foi avaliada apenas a condição de biodiesel a 50% v/v) para pH 5.0. As condições analisadas encontram-se registradas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Condições de ensaio em meio contendo metanol e biodiesel (T =30ºC)

Condição	Concentração de inóculo (g/L)	Concentração de metanol (v/v)	Concentração de Biodiesel	pH
B1	0,055	0.25%	0.25%	5,0
B2		0.25%	50%	
B3		-	50%	
B4		-	40%	
B5		-	20%	
B6	0,110	-	50%	

Em todos os ensaios realizados, os erlenmeyers foram deixados em agitação de 150 rpm e sob temperatura controlada de 30°C. O acompanhamento do perfil do crescimento celular foi realizado através da leitura de DO_{600} e, antes que as alíquotas fossem coletadas para leitura em espectrofotômetro, os erelenmeyers foram deixados em repouso para que ocorresse a separação das fases aquosa e orgânica. Após isto, alíquotas de 3 mL, retiradas com auxílio de seringas, foram levadas ao espectrofotômetro para a leitura da DO_{600}. A primeira leitura da DO_{600} foi feita no tempo inicial (0h), a segunda, após 12 horas de cultivo, e as demais leituras foram realizadas em intervalos de uma hora.

4.11.4 Cultivo na Presença de Gás Natural

De posse de observações extraídas da dissertação de Mestrado (Rodrigues, 2005) e dos resultados obtidos no item 4.11.1, os ensaios envolvendo como substrato o gás natural foram conduzidos à temperatura de 30°C, pH 6.5 e utilizando concentração celular inicial igual a 0,055 g/L.

Assim como foi feito para o metano, foi empregado o mesmo volume de 40 mL para a realização do ensaio. Assim, em erlenmeyers de 250 mL, foram colocadas alíquotas conhecidas da suspensão celular preparada conforme o

item 4.9 e do meio MSN, os quais ocupavam um volume total de 50 mL. Os erlenmeyers eram vedados antes da adição de gás natural no meio, a qual foi realizada com auxílio de uma seringa.

Após estes procedimentos, os erlenmeyers foram deixados sob agitação a 150 rpm em shaker orbital, sob temperatura controlada de 30°C. O perfil do crescimento celular foi acompanhado através da leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}), sendo a primeira leitura no tempo inicial (0h) e as demais a cada duas horas, por um período de 60 horas.

4.12 Método de Detecção de CO_2 como Medida de Biodegradação de Metano e Metanol

A rota de biodegradação de metano e de metanol pela bactéria *Methylosinus trichosporium* OB3b produz dióxido de carbono como produto final, e como intermediários formaldeído e ácido fórmico.

Uma metodologia de detecção proposta no presente trabalho, e na construção do biossensor, incluiu a medição do produto final da oxidação microbiológica, o dióxido de carbono, utilizando um eletrodo comercial de CO_2.

4.12.1 Obtenção da Curva de Calibração dos Eletrodos Comerciais de CO_2

Em análises químicas, a resposta de um procedimento analítico deve ser avaliada usando-se quantidades conhecidas do analito (os padrões), de forma que a resposta para uma quantidade desconhecida possa ser determinada. Tendo em vista esse propósito, foi necessário determinar a curva de calibração dos eletrodos de CO_2 com o objetivo de se construir uma equação mostrando a resposta de uma medida efetuada em milivolts em função de quantidades conhecidas do analito, e a partir da curva de calibração obtida, determinar valores desconhecidos do analito em questão.

No trabalho desenvolvido, foi utilizado inicialmente o eletrodo empregado nos estudos realizados no Mestrado (Rodrigues, 2005), o sensor Modelo 95-02, *Thermo Orion* (Figura 4.5) para os testes envolvendo condições de crescimento

tendo o metano como substrato. Nas etapas subseqüentes, foi utilizado o sensor modelo 4105, *Hanna Instruments* (Figura 4.6).

Figura 4.5: Eletrodo de CO_2 modelo 95-02, *Thermo Orion*.

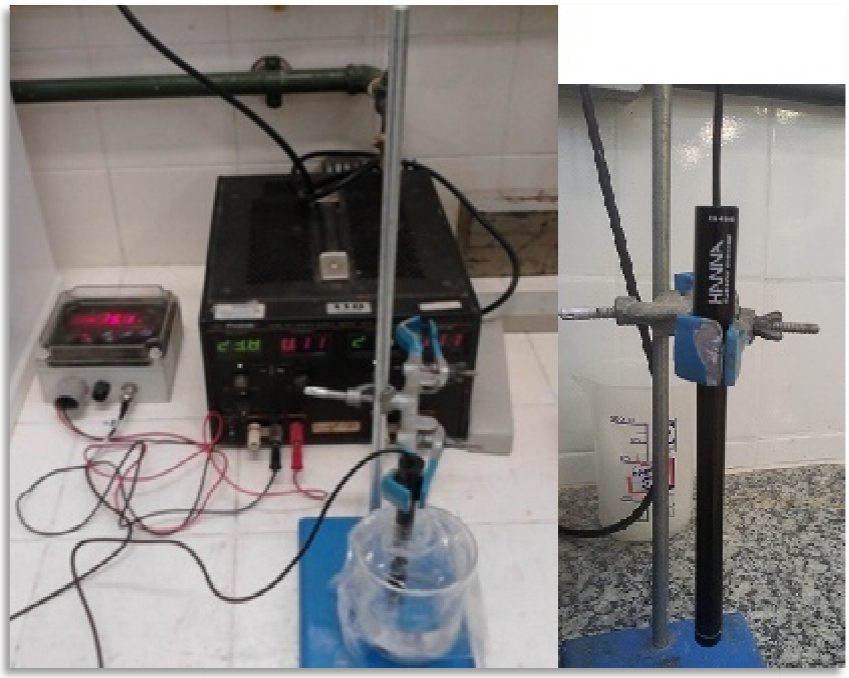

Figura 4.6: Eletrodo de CO_2 modelo HI 4105, *Hanna Instruments*.

Por possuírem mecanismos de operação iguais, ambos os eletrodos apresentam o mesmo procedimento de calibração, conforme descrito em seus manuais. Entretanto, para a calibração do eletrodo *Thermo Orion* foi utilizada uma solução padrão de carbonato de cálcio 1000 ppm (solução *Orion* nº 950207) e para o eletrodo *Hanna*, uma solução padrão de dióxido de carbono 0,10 mol/L (solução *Hanna* nº HI 4005-01). Em ambos, foi empregada uma solução tampão de dióxido de carbono (solução comercial obtida junto com a aquisição do eletrodo), responsável pela manutenção do pH na faixa requerida para a medição.

Para a construção da curva de calibração, cada eletrodo foi imerso em béqueres distintos contendo 50 mL de água deionizada e 5,0 mL de solução tampão de CO_2. Após o tempo necessário para estabilização, a leitura do sinal foi registrada (em mV), sendo esta leitura o potencial elétrico inicial (E_o). As demais leituras de potencial foram feitas através da adição de volumes distintos da solução padrão de dióxido de carbono aos béqueres, proporcionando, assim, diferentes concentrações de CO_2 no meio, do menos para o mais concentrado. De forma simplificada, a Figura 4.7 esquematiza o procedimento de calibração efetuado para ambos os eletrodos.

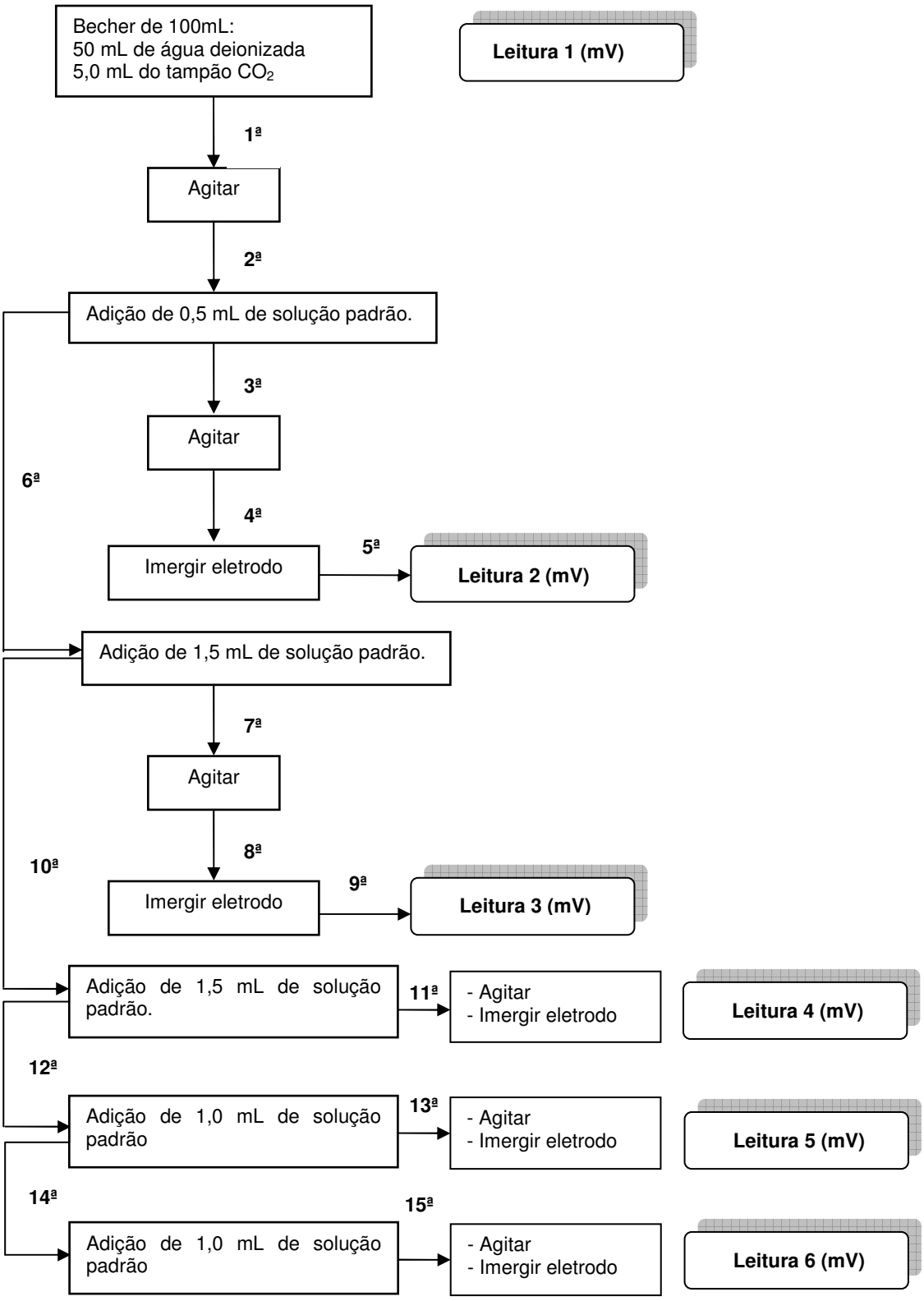

Figura 4.7: Esquema das etapas de calibração dos eletrodos de CO_2.

A partir do cálculo entre as diferenças de potencial elétrico (ΔE) e do conhecimento da concentração de CO_2 oriunda da adição da solução padrão, pode-se determinar a relação (equação de Nernst) correlacionando ΔE e o logaritmo da concentração de CO_2 em mol/L.

4.12.2 Procedimento para as Análises da Biodegradação de Metano e de Metanol

Concomitantemente a alguns cultivos celulares realizados, foram coletadas alíquotas da cultura em crescimento para serem efetuadas leituras com o eletrodo de dióxido de carbono.

Desta forma, foram feitos crescimentos de *M. trichosporium* OB3b, num período de no máximo de 24 horas (para metanol e biodiesel) e de no máximo 60 horas (para o gás natural) nas condições de inóculo inicial de 0,055 g/L e de 0,110 g/L, sob temperatura de 30ºC e pH 5.0. Alíquotas de 5 mL foram coletadas do meio de crescimento, com auxílio de seringas, no tempo inicial (0h), em 12 horas e, após este tempo, em intervalos de duas horas (para metanol e biodiesel) e de seis horas (para gás natural) para serem efetuadas leituras com o eletrodo de dióxido de carbono. Concomitantemente, alíquotas de 3 mL foram retiradas do meio para a leitura da densidade óptica a 600 nm com a finalidade de acompanhar o crescimento do micro-organismo ao longo do tempo.

Com a finalidade de verificar se o eletrodo operava adequadamente, em prática, foram efetuadas três leituras (em mV): **A**, **B** e **C**. A leitura **A** consistia na medida do potencial relativo à mistura água deionizada e solução tampão de dióxido de carbono. A leitura **B** indicava o potencial da mistura formada pela água deionizada mais a alíquota retirada do meio de cultivo. Após a estabilização da leitura **B**, solução tampão foi adicionada à mistura contendo água deionizada e amostra retirada do meio de cultivo, resultando, por fim, na leitura **C**. Os passos aqui descritos encontram-se registrados de forma esquemática na Figura 4.8

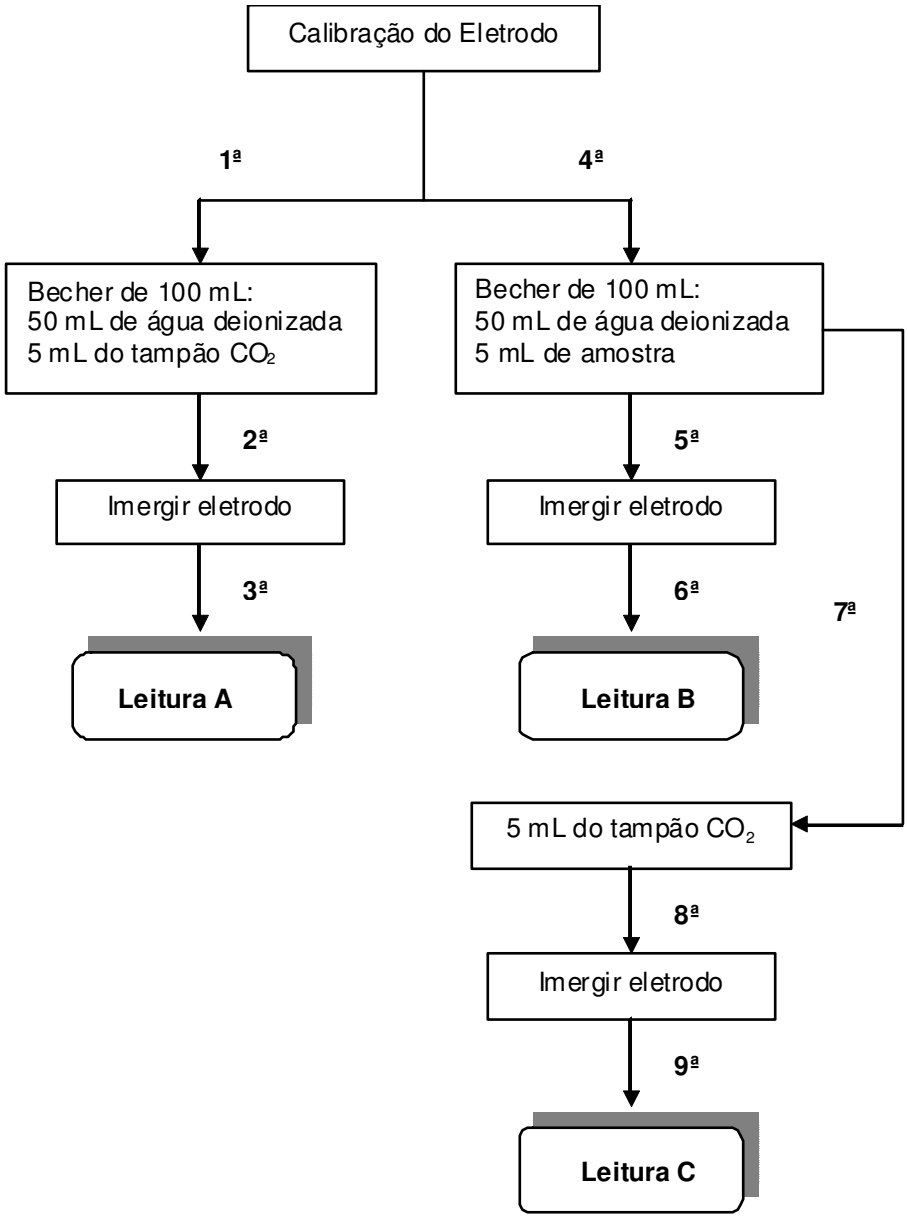

Figura 4.8: Esquema do procedimento das leituras de CO_2 formado pela biodegradação de metano e de metanol.

4.14 Análise Cromatográfica

O Gás Natural empregado nos testes foi analisado através da técnica de cromatografia gasosa para o conhecimento de sua composição antes do mesmo ser utilizado como substrato para *M. trichosporium* OB3b. Para isto, foi utilizado o Cromatógrafo Micro-CG 4900 (*VARIAN*).

Para a análise do teor de metanol no biodiesel a ser empregado nos testes experimentais, foi utilizado o Cromatógrafo GC-2010 (*SHIMADZU*). Uma fração deste biodiesel foi analisada depois que foi realizado o ensaio em meio contendo concentração inicial de inóculo de 0,055 g/L e biodiesel a 50% (v/v), para pH 5.0.

Os parâmetros dos cromatógrafos a gás empregados para análise de gás natural e de biodiesel encontram-se registrados a seguir na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Parâmetros de funcionalidade dos Cromatógrafos.

	Micro-CG 4900 (*VARIAN*)	GC-2010 (*SHIMADZU*)
Coluna	PPQ (10mx0,32mm x 3µm)	DB1 (30m x 0,32ID x 3)
Temperatura da Coluna	50ºC	50ºC
Detector	Condutividade Térmica (TCD)	Detector de ionização de chama (FID)
Temperatura do Detector	250ºC	150ºC
Temperatura do injetor	80ºC	150ºC
Gás de Arraste	Hélio	Hidrogênio

Capítulo 5: Resultados e Discussão

5.1 Estudo Inicial do Perfil de Crescimento de *Methylosinus trichosporium* OB3b em Metanol

Nesta fase, procurou-se realizar um estudo preliminar do perfil de crescimento celular do micro-organismo em presença de metanol em condições nas quais o micro-organismo foi proveniente de uma cultura mantida em meio sólido refrigerado. Para isso, células mantidas em meio sólido foram inoculadas em meio MSN e metanol, conforme descrito no item 4.6. Decorrido um prazo de vinte e quatro horas, alíquotas distintas, 3 mL e 6 mL, da suspensão celular obtida foram reinoculadas em meio MSN e metanol. O crescimento celular, nessas condições, foi acompanhado através da leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm durante um período de 90 horas (Figura 5.1). As medidas foram realizadas em duplicata e o maior desvio padrão obtido foi de 0,107.

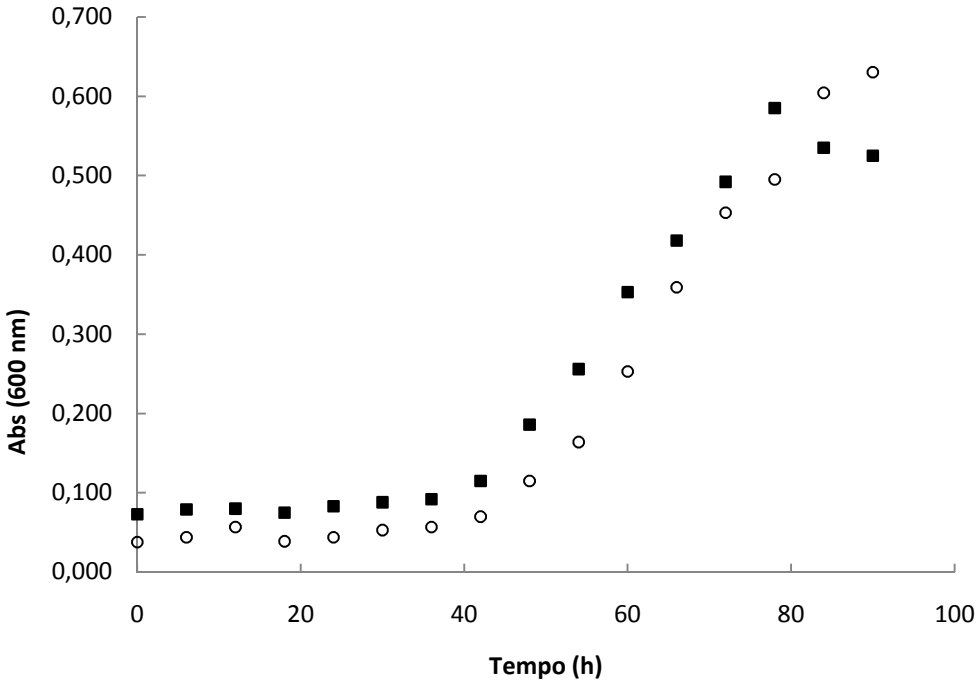

Figura 5.1: Curvas de crescimento de *M. trichosporium* OB3b em meio líquido MSN e na presença de metanol (▪ alíquota de 6 mL de suspensão celular; ◦ alíquota de 3 mL da suspensão).

Analisando os perfis de crescimento ilustrados na Figura 5.1, percebeu-se que o tempo de duração da fase lag, ou seja, o tempo de adaptação do micro-organismo foi muito longo, em torno de 40 h, indicando, assim, a necessidade de obtenção de uma suspensão celular na qual as células já se encontrassem em fase exponencial de crescimento, especialmente para aplicação no biossensor em função do tempo de resposta do método. Devido a esta observação, procedeu-se, então, à etapa de obtenção de um pré-inóculo descrito no item 4.7.

5.2 Relação Densidade Óptica e Concentração Celular

Conforme descrito no item 4.8, a curva de peso seco foi obtida após crescimento celular realizado até a obtenção da fase estacionária. Através das diluições realizadas, foi possível estabelecer uma relação entre a concentração de células com a medida da densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) para o metano (Figura 5.2) e para o metanol (Figura 5.3).

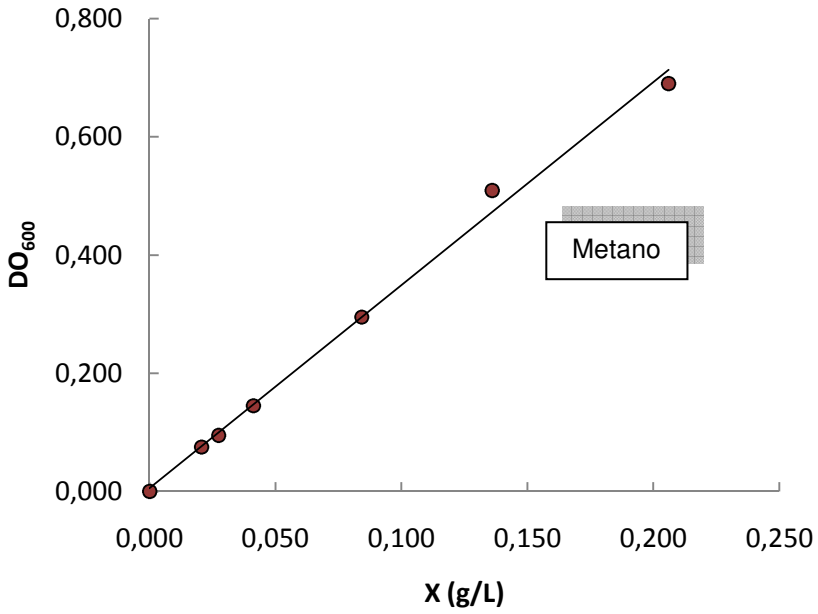

Figura 5.2: Correlação entre densidade óptica e concentração celular (substrato metano).

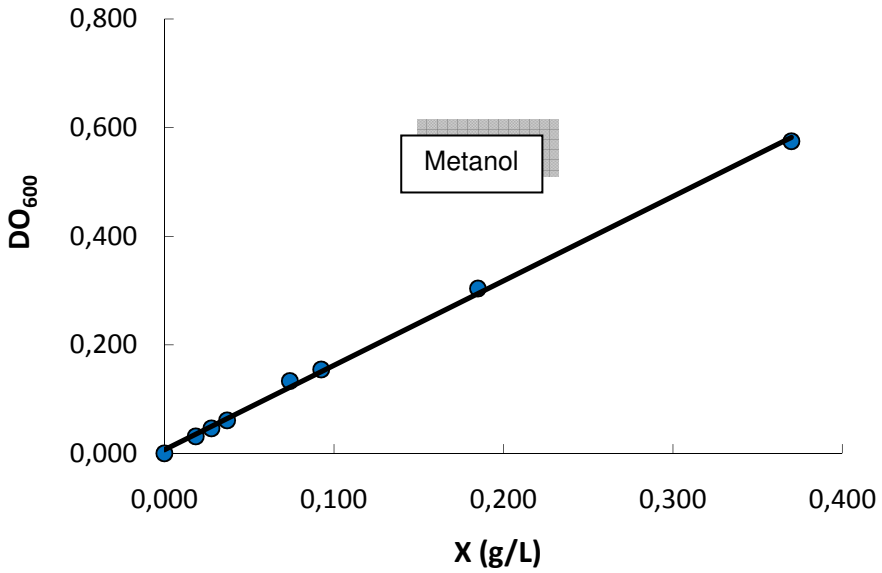

Figura 5.3: Correlação entre densidade óptica e concentração celular.

As equações representativas e seus respectivos coeficientes de correlação obtidos através do método de regressão linear foram:

Equação 1: $X\ (g/L) = \frac{(DO_{600} - 0{,}056)}{3{,}4338}$ (Metano) R^2 = 0,9951

Equação 2: $X\ (g/L) = \frac{(DO_{600} - 0{,}065)}{1{,}5559}$ (Metanol) R^2 = 0,9986

5.3 Identificação da Fase Exponencial de Crescimento para Cultivo Celular em Metanol

Após o estudo preliminar do crescimento celular (item 5.1), procedeu-se à realização de experimentos visando analisar o comportamento do micro-organismo utilizando uma suspensão celular concentrada obtida conforme descrita no item 4.9.

Para tal fim, diferentes alíquotas da suspensão celular, determinadas através da Equação 2 (item 5.2), foram inoculadas em erlenmeyers de 250 mL contendo meio MSN e metanol de forma a prover concentrações iniciais de

inóculo de 0,025 g/L e 0,075 g/L. Para cada uma dessas concentrações, foi avaliado o consumo de metanol nas concentrações em volume de 0,7% (v/v) e 1,3% (v/v). O acompanhamento do crescimento bacteriano, realizado através da medida da absorvância 600 nm, foi verificado durante um período de 90 horas. Os resultados encontram-se registrados nas Figuras 5.4 e 5.5. As medidas foram realizadas em duplicata e o maior desvio padrão obtido para a condição de Xo = 0,025 g/L foi de 0,160 e, para a condição de Xo = 0,075 g/L, 0,121, ambos para as medidas lidas em 42 horas de cultivo.

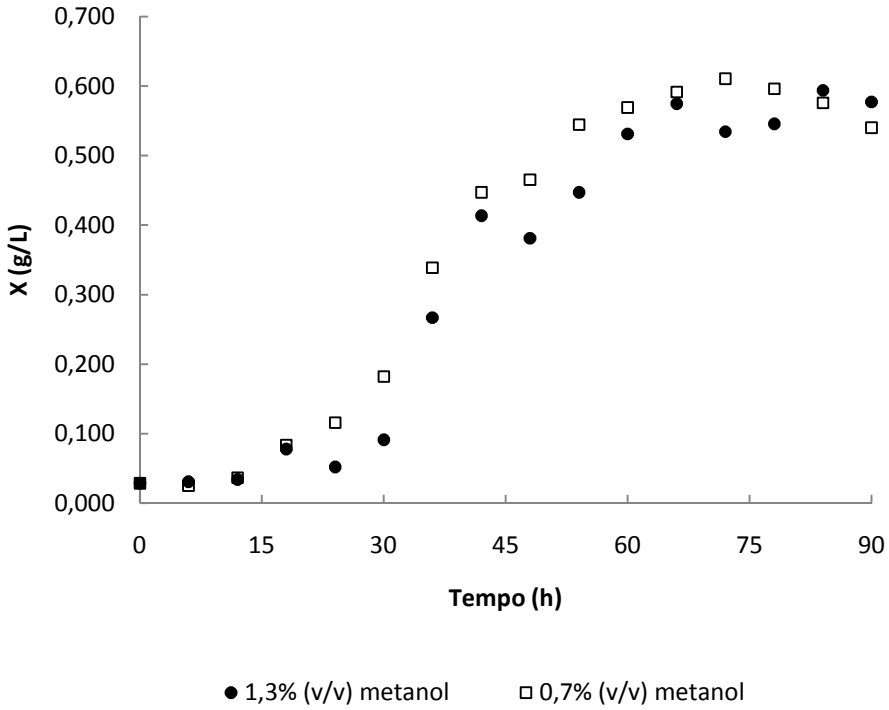

Figura 5.4: Crescimento Celular para X_o= 0,025 g/L e diferentes concentrações de metanol (pH = 6.5; T = 30ºC).

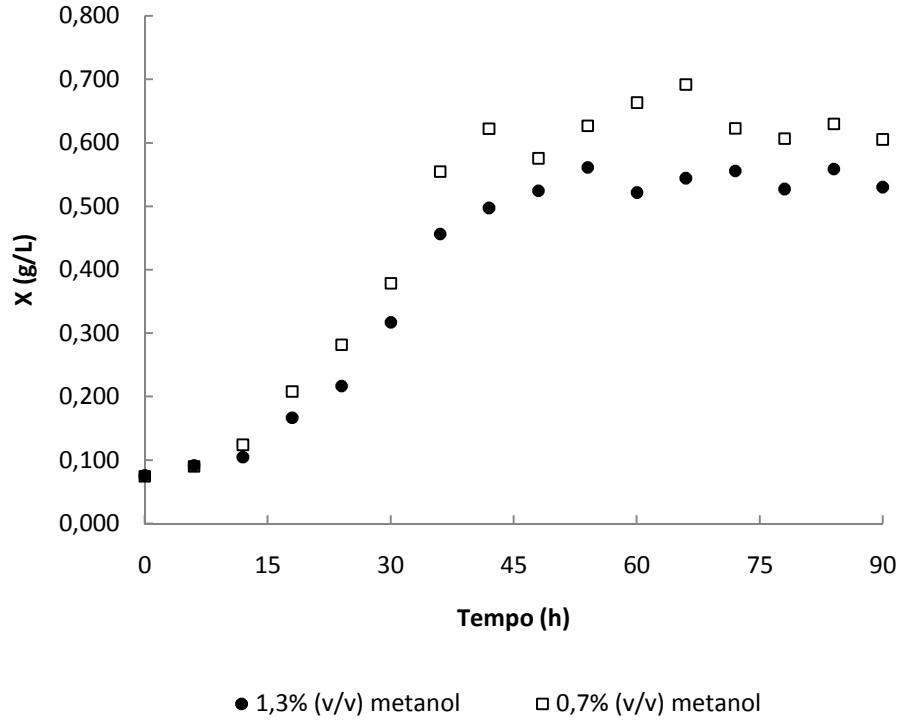

Figura 5.5: Crescimento Celular para X_o= 0,075 g/L e diferentes concentrações de metanol (pH = 6.5; T = 30ºC).

Analisando-se as figuras 5.4 e 5.5, o primeiro ponto relevante observado, quando comparado aos resultados mostrados na Figura 5.1, é o fato da importância do preparo do inóculo inicial especificado no item 4.9. O tempo de duração da fase lag reduziu consideravelmente, cerca de vinte e cinco horas, quando foi utilizada uma suspensão celular em fase de crescimento exponencial, uma vez que as células estavam adaptadas às condições de cultivo.

Outras observações relevantes nessa fase de estudo são os perfis de crescimento obtidos para as diferentes condições de concentração de metanol (única fonte de carbono presente no meio de cultivo) e de concentração inicial de inóculo. Em todos os casos aqui avaliados, a bactéria foi capaz de degradar, de forma eficaz, a quantidade de metanol presente no meio, independente da concentração deste e da concentração de inóculo empregada.

Sob a perspectiva do uso de bactérias *M. trichosporium* OB3b como biocomponente na construção de um biossensor, é importante conhecer em que faixa de concentração do substrato o micro-organismo é capaz de degradá-lo. Isto é um fator importante, pois está relacionado com a faixa de sensibilidade analítica. Nesta etapa, embora tenham sido utilizadas quantidades de metanol bem distintas, o micro-organismo ainda se mostrou capaz em biodegradá-lo de forma eficiente.

5.4 Ensaios Envolvendo Diferentes Condições de Cultivo Celular

Nos próximos tópicos, serão relatados os resultados encontrados nos ensaios envolvendo diferentes meios de cultivo, que foram realizados com a finalidade de identificar e verificar quais as condições em que o micro-organismo seria capaz de biodegradar os substratos de interesse para sua potencial aplicação como biocomponente do biossensor microbiano proposto.

Com a finalidade de se avaliar concomitantemente a produção de dióxido de carbono a partir de diferentes condições de cultivo em presença dos substratos metano, metanol, biodiesel e gás natural, procedeu-se inicialmente à determinação da curva de calibração do eletrodo de dióxido carbono (*Thermo Orion*) utilizado nos estudos prévios da dissertação de Mestrado (Rodrigues, 2005).

Entretanto, as tentativas de calibração do eletrodo *Thermo Orion*, utilizando soluções padrão dentro do prazo de validade, não foram bem sucedidas. O sensor foi enviado para análise e foi detectado que o mesmo estava inoperante. Com isto, foi adquirido um novo eletrodo (*Hanna Instruments*) para a determinação de dióxido de carbono resultante da oxidação microbiológica de cada substrato empregado por *Methylosinus trichosporium* OB3b, sendo que os estudos descritos no próximo tópico foram conduzidos enquanto aguardava a chegada deste eletrodo.

5.4.1 Cultivo Celular na Presença de Metano

Estudos de biodegradação de metano por *Methylosinus trichosporium* OB3b para diferentes concentrações de inóculo (0,0208; 0,0481; 0,0700; 0,1493 g/L), temperatura (20; 30; 40°C), volume de metano (40; 60 mL) e pH (4.8; 5.2; 6.5) foram preliminarmente realizados (Rodrigues, 2005). Os resultados mostraram que o micro-organismo se mostrou eficaz em oxidar o metano para as condições de temperatura de 30ºC, pH 6.5, empregando-se 40 mL de metano no meio de cultivo.

Nesta etapa, duas novas concentrações de inóculo (0,055 g/L e 0,110 g/L) foram testadas para avaliação do crescimento celular, antes da utilização do sensor de dióxido de carbono, com o intuito de identificar a partir de qual momento amostras do meio de crescimento poderiam ser coletadas para a medição da quantidade de dióxido de carbono produzido pelo consumo de metano por *M. trichosporium* OB3b.

O crescimento celular foi acompanhado durante um período de 72 horas através das medidas de DO_{600}. Os resultados para as médias das medidas e seus respectivos desvios padrão encontram-se registrados nas Figuras 5.6 e 5.7.

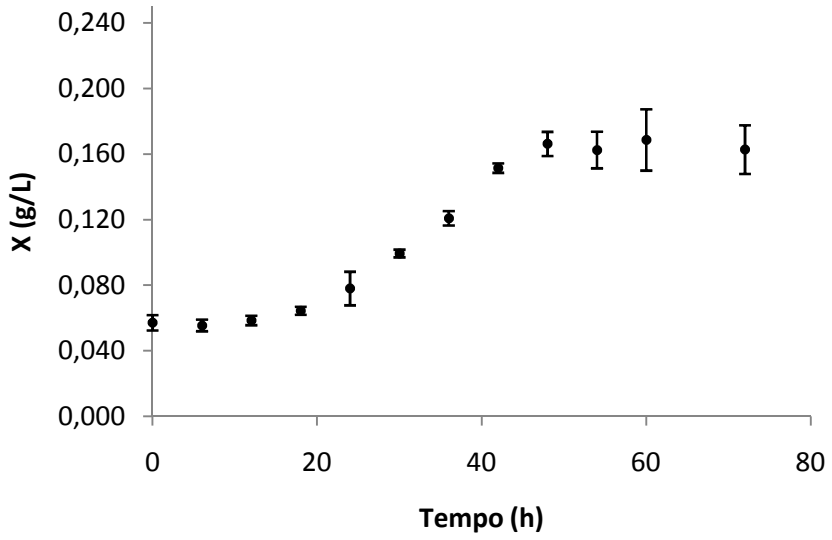

Figura 5.6: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e 40 mL de metano (pH = 6.5; T = 30ºC).

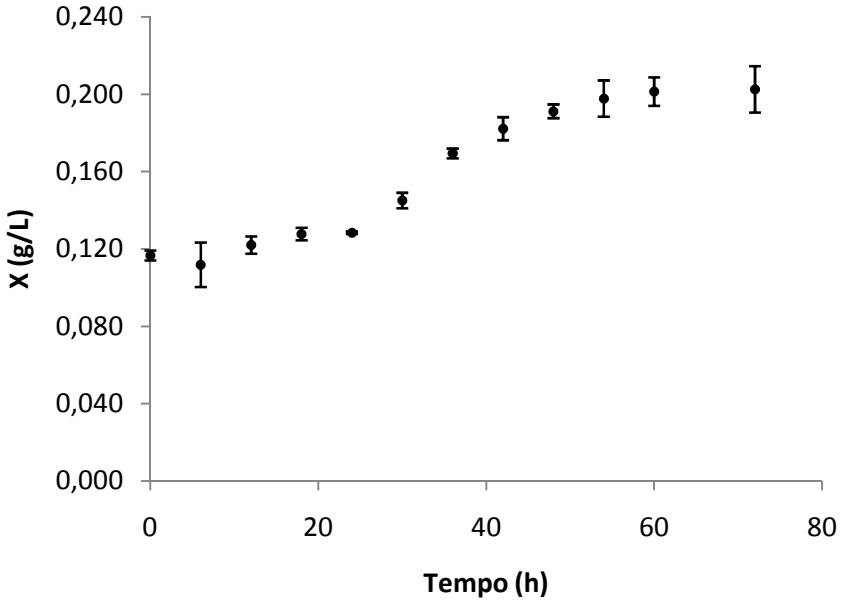

Figura 5.7: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e 40 mL de metano (pH = 6.5; T = 30ºC).

Com a finalidade de melhor avaliar e comparar as características de crescimento celular a partir de diferentes concentrações iniciais de inóculo, foram determinados os valores aproximados da variação da concentração celular (ΔX), do tempo de duração da fase lag (Δt_{lag}), do tempo de duração da fase exponencial (Δt_{exp}) e da taxa específica de crescimento (μ_X). Estes parâmetros estão sumarizados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Valores de ΔX, Δt_{lag}, Δt_{exp} e μ_X para diferentes concentrações celulares iniciais de inóculo (T = 30°C; pH = 6,5; 40 mL de metano; t = 72 h).

	Concentração Inicial de Inóculo (X_o)	
	0,055 g/L	**0,110 g/L**
ΔX	0,102 g/L	0,0693 g/L
Δt_{lag}	18 h	24 h
Δt_{exp}	30 h	20 h
μ_X	0,035	0,020

Avaliando os dados apresentados na Tabela 5.1, para a concentração inicial de inóculo de 0,055 g/L, o micro-organismo se mostrou mais eficiente no consumo de metano, pois nesta concentração o mesmo permaneceu por mais tempo na fase exponencial de crescimento, demonstrando um maior potencial na degradação de metano por maior tempo, além disso a fase de adaptação (fase lag) da bactéria às novas condições foi alcançada mais rapidamente. Além disso, o maior valor da taxa específica de crescimento para X_o= 0,055 g/L corroborou para a conclusão relatada.

5.4.2 Cultivo Celular na Presença de Metanol

Nesta etapa, os ensaios foram limitados ao estudo do comportamento do crescimento do micro-organismo durante a fase exponencial de crescimento, visto que nesta fase o micro-organismo encontra-se em plena atividade metabólica, o que é importante para o consumo do substrato e, consequentemente, para sua aplicação como componente biológico do biossensor.

Baseando-se nos resultados observados nas figuras 5.4 e 5.5 do item 5.3, os quais mostraram que, para as condições experimentais analisadas, o tempo de duração da fase lag durou cerca de doze horas, procurou-se então fazer um estudo do perfil de crescimento após 12 h de inoculação, pois a partir desse momento, as células já se encontrariam na fase exponencial de crescimento.

Nesta etapa de estudo, procurou-se também avaliar a alteração do pH do meio de cultivo, de 6.5 para 5.0, visando a utilização futura do sensor de dióxido de carbono que tem como pré-requisito, para seu funcionamento, que as amostras a serem analisadas possuam pH variando na faixa de 4.8 a 5.2, como também a utilização de uma concentração de metanol próxima ao valor máximo do que é permitido em biodiesel de acordo com a Resolução ANP nº07 de 2008 (Tabela 3.3 do Capítulo Revisão Bibliográfica).

Assim, nos experimentos envolvendo o metanol como substrato, foram utilizadas as mesmas condições de preparo do inóculo, de temperatura e de agitação mencionadas anteriormente, sendo alterados os parâmetros de concentração inicial de inóculo, concentração de metanol e pH, conforme os registros constantes na Tabela 4.4 do item 4.11.2 O crescimento celular foi acompanhado através da medida da DO_{600} e com o auxílio da Equação 2 (item 5.2), os valores de concentração celular ao longo do tempo foram determinados. Os resultados obtidos serão apresentados separadamente em dois blocos em função do valor de pH. Cabe salientar que, para cada condição avaliada, as medidas experimentais representadas graficamente indicam a média de medidas de ensaios realizados em triplicata, e os desvios padrões obtidos encontram-se representados através de barras de erros.

Para o cultivo celular realizado em pH 6.5, foram avaliadas as seguintes concentrações iniciais de inóculo (g/L): 0,055; 0,110; 0,200 e 0,228, e as seguintes concentrações de metanol (v/v): 0,5%; 1,0% e 1,3%. Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.8 a 5.11, sendo que as Figuras 5.8 e 5.9 foram desmembradas para melhor apresentação dos desvios referentes às medidas efetuadas em triplicata.

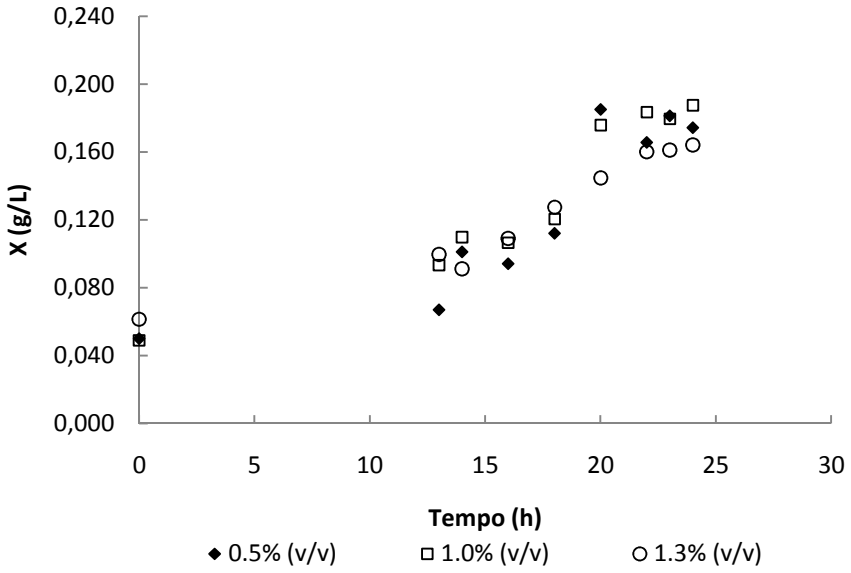

Figura 5.8: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e diferentes concentrações de metanol (pH = 6.5; T = 30ºC).

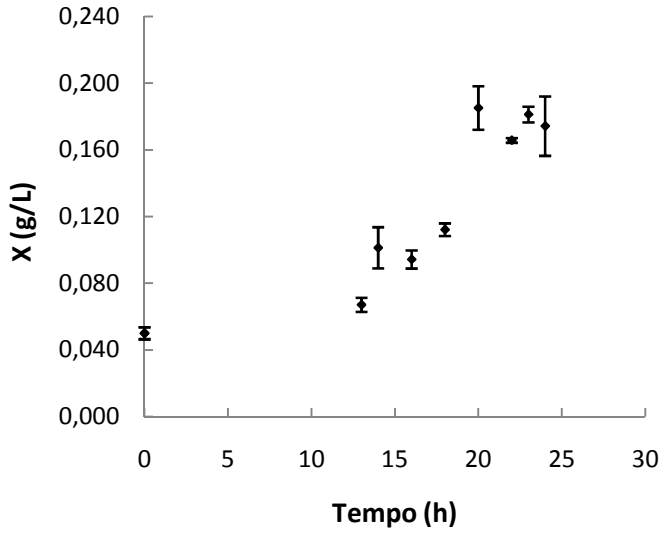

Figura 5.8.a: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e metanol a 0,5% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC).

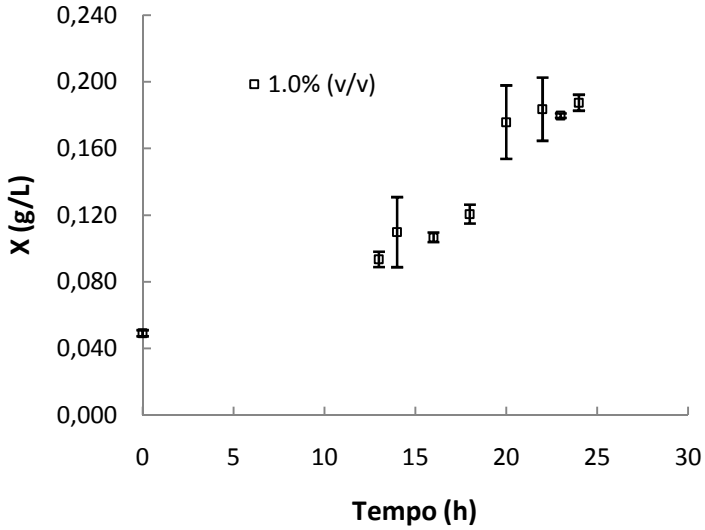

Figura 5.8.b: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e metanol a 1,0% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC).

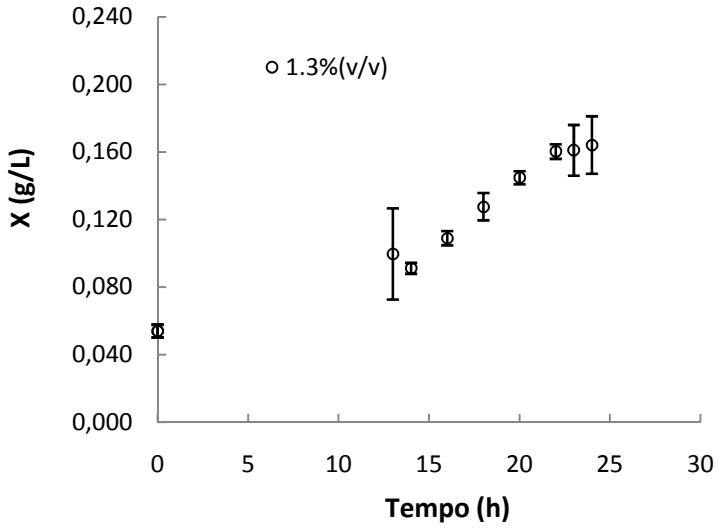

Figura 5.8.c: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e metanol a 1,3% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC).

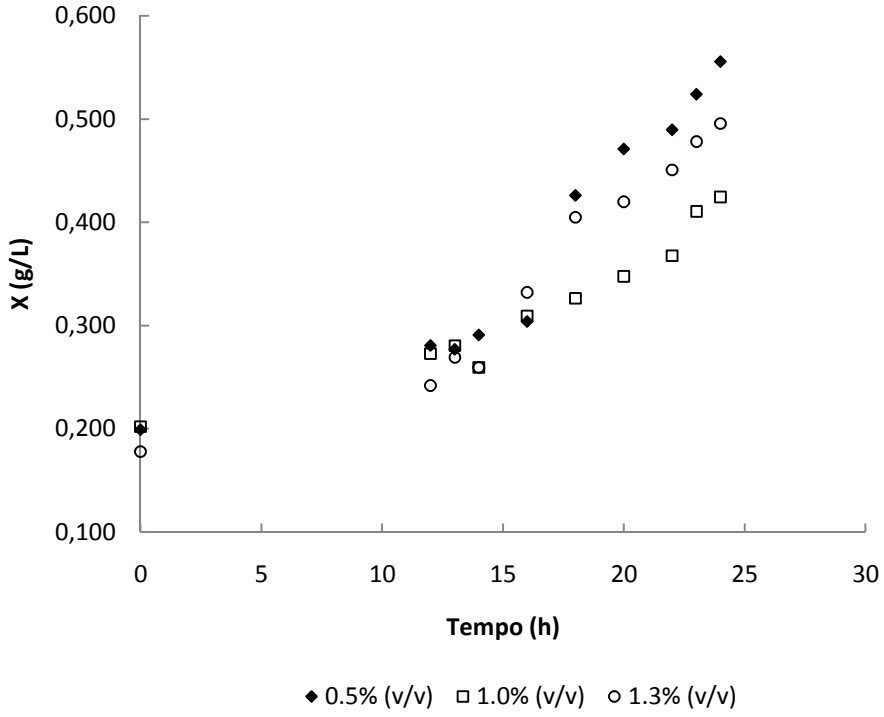

Figura 5.9: Crescimento Celular para X_o= 0,200 g/L e diferentes concentrações de metanol (pH = 6.5; T = 30ºC).

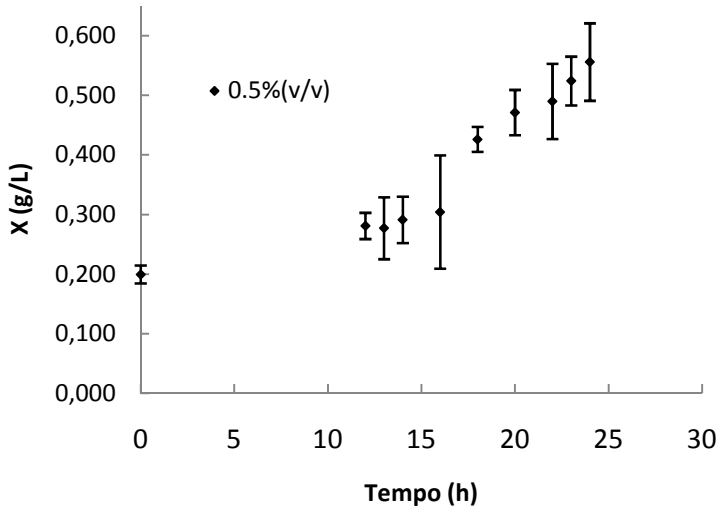

Figura 5.9.a: Crescimento Celular para X_o= 0,200 g/L e metanol a 0,5% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC).

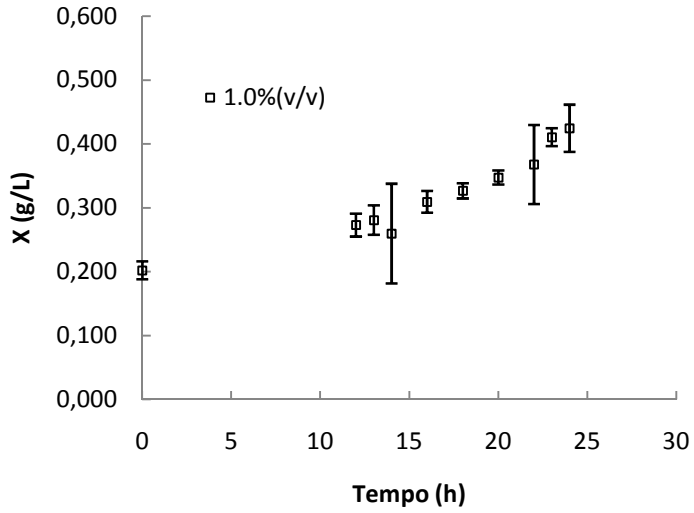

Figura 5.9.b: Crescimento Celular para X_o= 0,200 g/L e metanol a 1.0% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC).

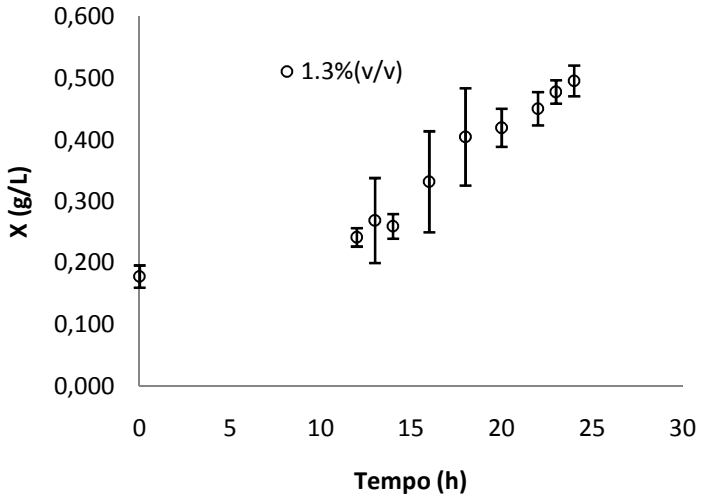

Figura 5.9.c: Crescimento Celular para X_o= 0,200 g/L e metanol a 1.3% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC).

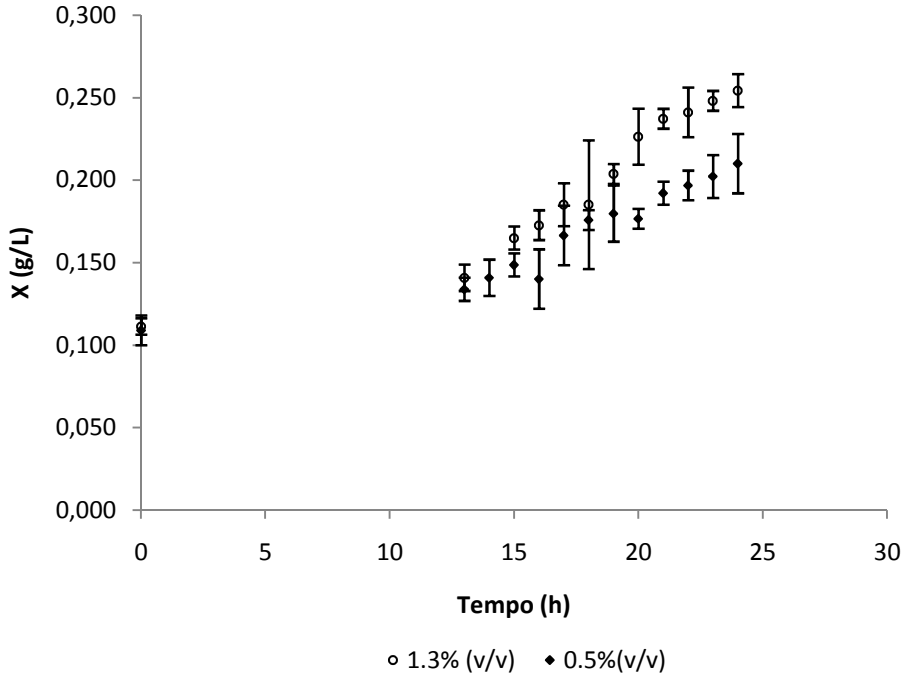

Figura 5.10: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e metanol a 0,5 % (v/v) e a 1.3% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC).

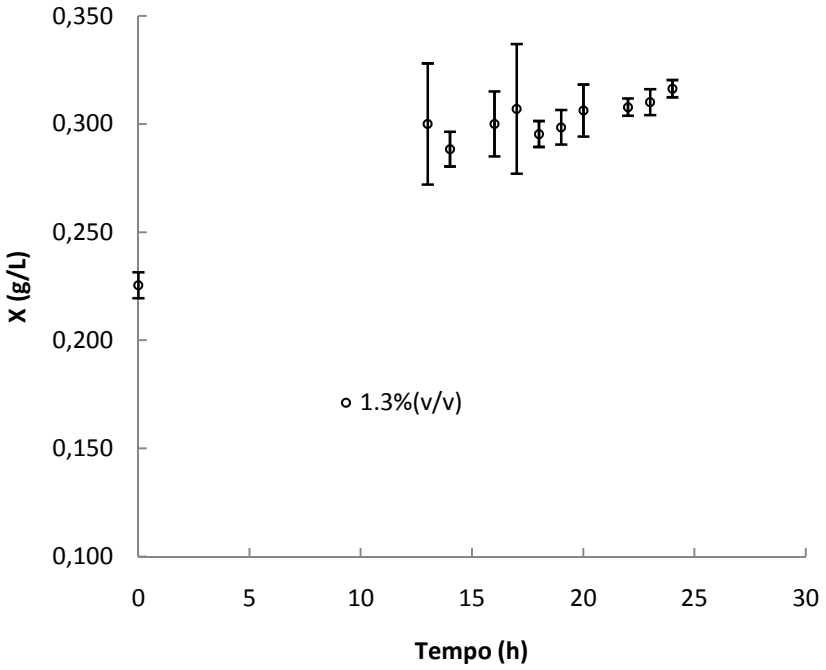

Figura 5.11: Crescimento Celular para X_o= 0,228 g/L e metanol a 1.3% (v/v) (pH = 6.5; T = 30ºC).

A análise das figuras 5.8 a 5.10 mostrou que para as concentrações iniciais de inóculo de 0,055 g/L, 0,110 g/L e 0,200 g/L, o micro-organismo foi capaz de degradar o metanol independente da concentração deste no meio. Contudo, quando a concentração de inóculo foi de 0,228 g/L, em metanol com concentração de 1,3% (v/v) (Figura 5.11), observou-se que houve um pequeno aumento na concentração de biomassa para o mesmo intervalo de tempo estudado para as condições ilustradas nas figuras 5.8 a 5.10. Isto pode ser explicado pelo fato de que, devido os experimentos terem sido realizados em cultivos em batelada, a concentração de nutrientes diminuiu e o acúmulo de compostos tóxicos aumentou no meio de cultivo, favorecendo um balanço negativo entre a divisão celular e a morte de células. Além disso, provavelmente, uma elevação na concentração de células, sem concomitante aumento da oferta de substrato no meio, pode ter sido outro fator que tenha contribuído para o resultado obtido.

Com o propósito de avaliar a mudança de pH do meio e de utilizar uma concentração de metanol inferior às demais, uma vez que os ensaios

desenvolvidos nesta etapa procuravam se aproximar das condições experimentais posteriores (uso de biodiesel e do sensor de CO_2), foi decidido realizar ensaios para as concentrações iniciais de inóculo de 0,055 g/L e de 0,110 g/L, visto que para estas concentrações resultados positivos foram obtidos. Ademais, para tais concentrações, na utilização de metano como substrato, resultados igualmente satisfatórios foram observados (item 5.4.1). Estas premissas são relevantes no que se refere ao desenvolvimento do biossensor microbiano para ambos os analitos, ou seja, ter um biossensor com parâmetros semelhantes para a análise tanto de metano, quanto de metanol.

Desta forma, para as concentrações iniciais de inóculo de 0,055 g/L e 0,110 g/L, foi avaliada a mudança do pH do meio de cultura de 6.5 para 5.0 para metanol em concentrações de 1.3% (v/v) e 0.25% (v/v). As Figuras 5.12 a 5.14 ilustram os resultados obtidos.

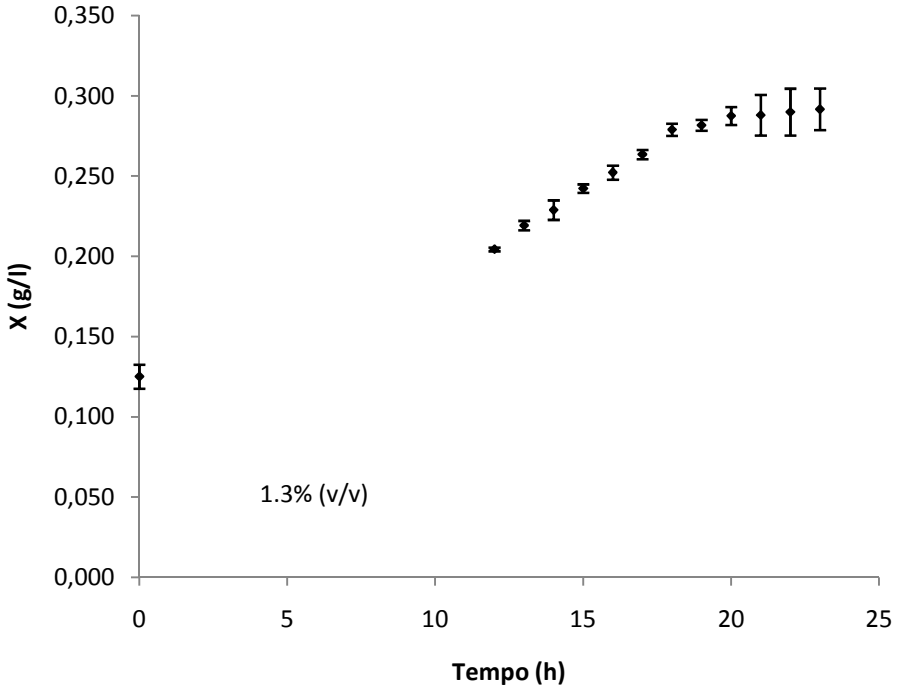

Figura 5.12: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e metanol a 1.3% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

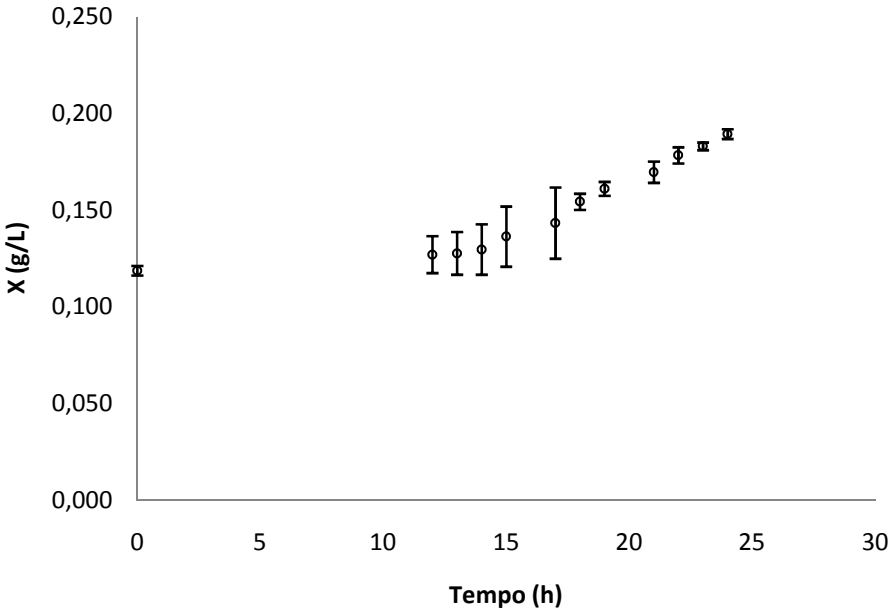

Figura 5.13: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e metanol a 0.25 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

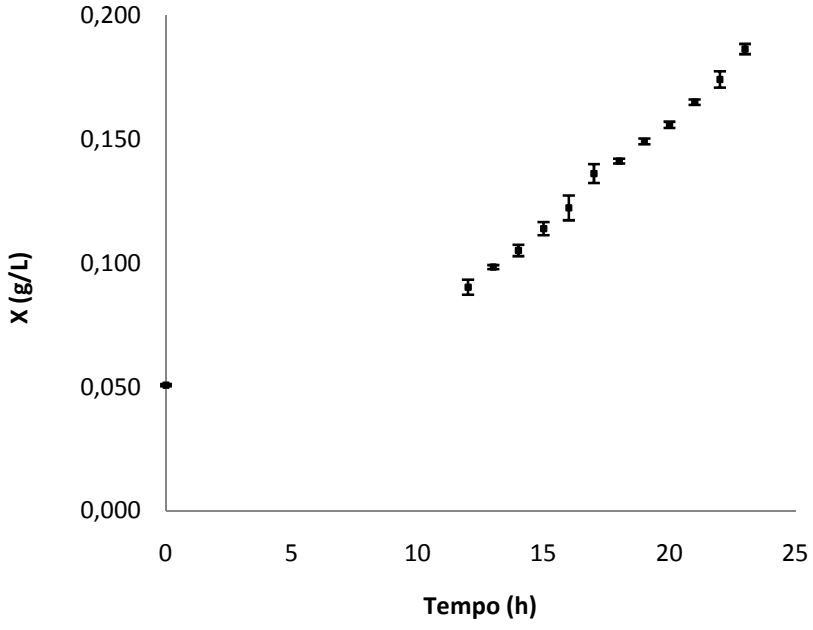

Figura 5.14: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e metanol a 0.25 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

Pela análise das Figuras 5.12 a 5.14, concluiu-se que o micro-organismo foi eficiente em degradar o metanol mesmo quando o pH do meio de cultura foi reduzido para 5.0, independentemente da concentração de metanol e da concentração inicial de inóculo utilizados. Esta observação pode ser explicada por dois fatores, ambos relacionados com a via de oxidação de metanol por *Methylosinus trichosporium* OB3b (Figura 5.15). O primeiro fator está ligado à enzima responsável pela oxidação de metanol no processo de biodegradação, a enzima desidrogenase (MDH). De acordo com Anthony (1982) e Sullivan *et al*. (1998), a maioria das enzimas MDHs encontrados em micro-organismos metilotróficas possuem pH ótimo de 9, mas a enzima é estável a pH 4.0, sendo assim consideradas ácido-estáveis. O segundo fator que está relacionado com o fato de que, naturalmente, o meio de cultura torna-se mais ácido, devido à formação de ácido fórmico, outro subproduto da rota de biodegradação do metanol por *Methylosinus trichosporium* OB3b.

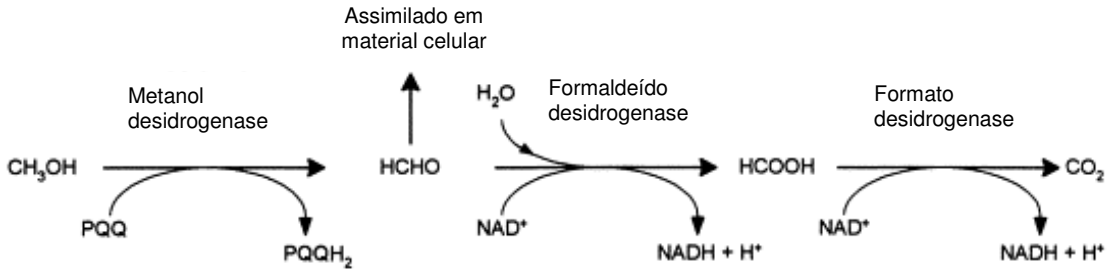

Figura 5.15: Rota de biodegradação de metanol por *Methylosinus trichosporium* OB3b (Adaptado de Cornish *et al*., 1984).

As taxas específicas de crescimento para os ensaios descritos neste item encontram-se registradas na Tabela 5.2. A partir dos valores obtidos e do intuito em realizar os ensaios experimentais em condições de pH 5.0, verificou-se que a concentração inicial de inóculo que deveria ser empregada seria a concentração de 0,055 g/L.

Tabela 5.2: Taxa específica de crescimento para metanol como substrato.

Concentração Inicial de Inóculo (g/L)	Conc. de Metanol (v/v)	pH	Taxa Específica de Crescimento (h^{-1})
0,055	0,5%	6,5	0,098
	1,3%		0,080
	0,25%	5,0	0,067
0,110	0,5%	6,5	0,041
	1,3%		0,063
	0,25%	5,0	0,038
	1,3%		0,049

5.4.3 Cultivo Celular na Presença de Biodiesel

Após verificar que o micro-organismo foi efetivo na degradação de metanol, mesmo em concentração de 0.25% (v/v), procedeu-se à investigação se resultados satisfatórios seriam obtidos na presença de biodiesel no meio de cultivo. Assim, nesta etapa, amostras do biodiesel, obtido através da reação de transesterificação entre óleo de soja e metanol, foram empregadas.

Inicialmente, foram realizados testes para verificar se a presença do biodiesel no meio de cultivo seria capaz de impedir o crescimento do micro-organismo. Para tal, o ensaio realizado com concentração inicial de inóculo de 0,055 g/L e concentração de metanol de 0.25% (v/v), realizado para pH 5.0 (Figura 5.14), foi refeito acrescentando-se ao meio de crescimento 0.25% (v/v) de biodiesel. A escolha em realizar o teste com concentração de inóculo de 0,055 g/L foi em virtude de se ter observado que, para esta concentração, o micro-organismo mostrou maior rapidez em seu crescimento, evidenciado pelos valores das taxas específicas de crescimento (Tabela 5.2), ou seja, partindo-se da premissa de que o micro-organismo ao consumir o substrato para produção de material celular também produz paralelamente dióxido de carbono por catabolismo, e sendo a condição de Xo = 0,055 g/L a que se observou crescimento celular expressivo, então para esta concentração a

quantidade de CO_2 gerada seria maior, o que implicaria no tempo de resposta do sensor de dióxido de carbono e, por conseqüência, no tempo de resposta do biossensor microbiano proposto.

O acompanhamento do crescimento celular, através da medida de DO_{600}, foi feito retirando alíquotas da fase aquosa com o auxílio de uma seringa. A primeira medida foi realizada no início do ensaio (0 h), a segunda medida, após 12 horas, e as demais em intervalos de uma hora. A Figura 5.15 contém os resultados obtidos neste ensaio.

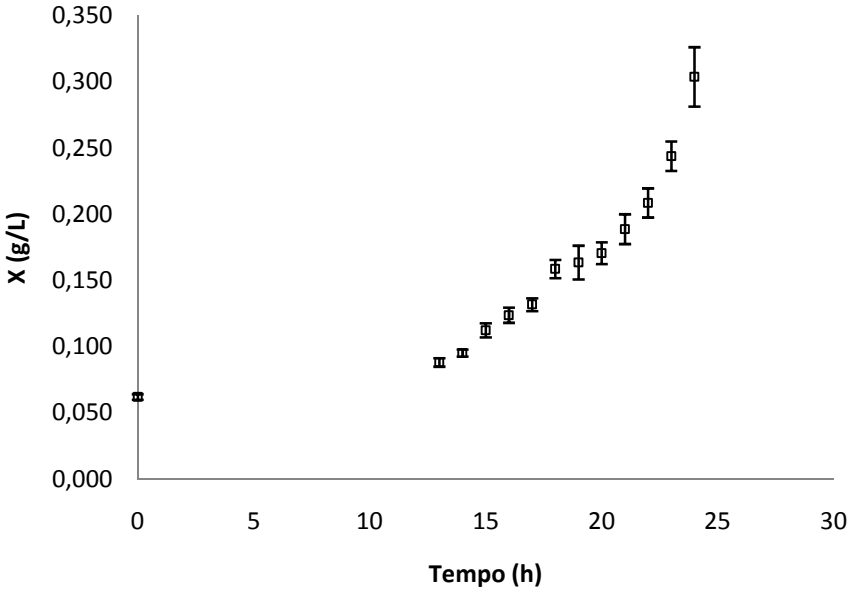

Figura 5.15: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L; metanol a 0.25 % (v/v) e biodiesel a 0.25% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

Após a constatação de que o micro-organismo seria capaz de crescer em um sistema bifásico, contendo baixa concentração de biodiesel em meio salino nitrato (MSN) em proporção elevada comparado ao biodiesel, passou-se à etapa de estudo no qual o micro-organismo foi inoculado em meio contendo biodiesel e meio MSN na proporção de 1:1.

Neste ponto, cabe ressaltar que o biodiesel de soja metílico utilizado nos ensaios apresentava teor de metanol de 0,1453% (m/m) – dado informado pelo fornecedor – e partindo-se do conhecimento dos parâmetros de densidade do metanol e da massa específica do biodiesel, prevista na Resolução ANP

07/2008, seria necessário grande concentração de biodiesel no meio de cultivo, cerca 78% (v/v) para que fosse fornecida a quantidade de metanol empregada nos ensaios contendo 0,25% (v/v) (item 4.4.2). Entretanto, levando-se em consideração também que o meio salino nitrato (MSN) constitui-se em insumo relevante capaz de permitir a nutrição e o crescimento do micro-organismo, na etapa experimental subsequente, pretendeu-se avaliar o perfil de crescimento celular em presença de biodiesel a 50% (v/v) e de meio MSN a 50% (v/v), acrescido de metanol a 0.25% (v/v) para a concentração inicial de inóculo de 0,055 g/L. A Figura 5.16 ilustra os resultados obtidos através de medidas de leitura da densidade óptica DO_{600} durante 24 horas de cultivo.

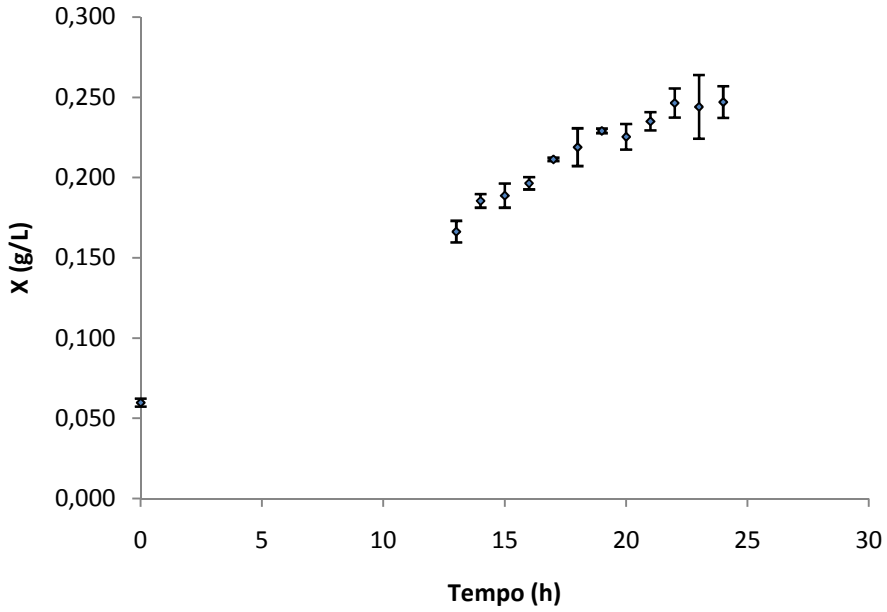

Figura 5.16: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L; metanol a 0.25 % (v/v) e biodiesel a 50% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

Analisando-se a Figura 5.16, notou-se que o micro-organismo foi capaz de crescer mesmo em meio de cultivo adverso aos ensaios anteriores, o que trouxe como hipótese de que *M. trichosporium* OB3b estaria também utilizando o metanol presente no biodiesel, além do metanol utilizado como suprimento, Em virtude do resultado observado neste estudo, passou-se à realização de um ensaio contendo biodiesel a 50% (v/v), sem adição de metanol como suplemento, para Xo = 0,055 g/L. Os resultados para esta condição encontram-se registrados na Figura 5.17.

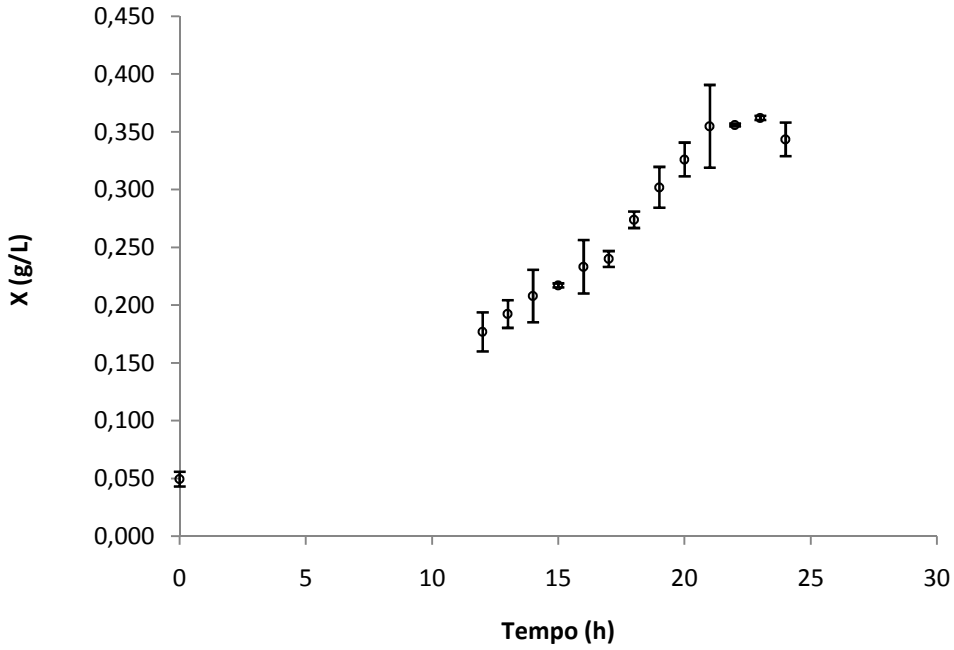

Figura 5.17: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e biodiesel a 50% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

A partir dos resultados ilustrados nas Figuras 5.15 a 5.17, foi possível verificar que o micro-organismo se mostrou eficaz na adaptação a condições de crescimento adversas às empregadas nos ensaios prévios realizados sem a presença do biodiesel no meio de cultivo (item 5.4.2). Para todos os ensaios tendo biodiesel no meio de cultivo, com ou sem a presença do metanol, ocorreu significativa produção de material celular, o que foi percebido pela elevação da concentração celular ao longo do tempo, sendo ainda maior nos casos onde foi utilizando maior quantidade de biodiesel no meio de crescimento. Esta observação levou à suposição de que o micro-organismo poderia estar utilizando uma fonte de carbono diferente do metanol. Desta forma, ensaios posteriores foram realizados de forma a buscar resultados que pudessem sustentar ou não tal observação.

Além disso, de acordo com referências encontradas na literatura (HANSON e HANSON, 1996; JIANG *et al.*, 2010; SOE, 2012), a grande versatilidade catalítica da enzima Metano Mono-oxigenase (MMO), presente

nos organismos metanotróficos, pode explicar os resultados satisfatórios obtidos mesmo quando o biodiesel foi utilizado no meio de crescimento.

A enzima MMO se apresenta sob duas formas: uma particulada (pMMO), presente na membrana celular de todas as metanotróficas, com exceção do gênero *Methylocella* spp. (THEISEN *et al*., 2005); e uma solúvel citoplasmática (sMMO), encontrada apenas em algumas espécies (MURRELL e RADAJEWSKI, 2000), dentre elas *Methylosinus trichosporium* OB3b. Estas duas formas da enzima MMO apresentam diferenças em especificidades de substratos, sendo a forma sMMO a enzima que é capaz de oxidar uma ampla faixa de substratos orgânicos, tais como hidrocarbonetos saturados, insaturados, lineares, ramificados, cíclicos; compostos aromáticos, heterocíclicos, compostos clorados e muitos outros (JIANG *et al*., 2010; SOE, 2012). Esta característica peculiar da forma sMMO poderia, assim, explicar os resultados dos ensaios realizados em presença de biodiesel.

Novas pesquisas devem ser realizadas com o intuito de melhor entender e explicar os mecanismos moleculares pelos quais as bactérias metanotróficas se adaptam a várias condições de estresse, como mudanças no pH e presença em compostos químicos variados (JIANG *et al*., 2010). O conhecimento destes mecanismos é de extrema importância no que tange à aplicação do micro-organismo como elemento biológico na construção do biossensor microbiano para metanol em biodiesel, uma vez que se o biocomponente não apresentar seletividade ao analito de interesse, entre outros presentes na amostra, o biossensor terá sua especificidade prejudicada e, conseqüentemente, menor será a sua sensibilidade.

5.5 Curva de Calibração do Eletrodo

O eletrodo de Dióxido de Carbono, modelo HI 4105 (*Hanna Instruments*), utilizado como transdutor do sistema biossensor proposto, é uma célula potenciométrica completa constituída pelo eletrodo de referência (prata-cloreto de prata) e pelo eletrodo indicador (eletrodo de pH). Estes elementos estão alojados dentro de um corpo termoplástico contendo solução eletrolítica de íon

cloreto e são isolados da amostra por uma membrana fina, permeável a CO_2, denominada PTFE (Politetrafluoretileno).

Antecipadamente aos ensaios envolvendo a utilização do eletrodo para quantificação de dióxido de carbono gerado através da biodegradação dos analitos de interesse, procedeu-se à construção de sua curva de calibração, conforme descrita no item 4.12.1 do Capítulo Material e Métodos, correlacionando os valores de potencial em mV obtidos a partir de alíquotas conhecidas de solução padrão 0,1 M de CO_2 (solução HI 4005-01), resultando a curva representada na Figura 5.18 e a Equação (3) com coeficiente de Correlação 0,989.

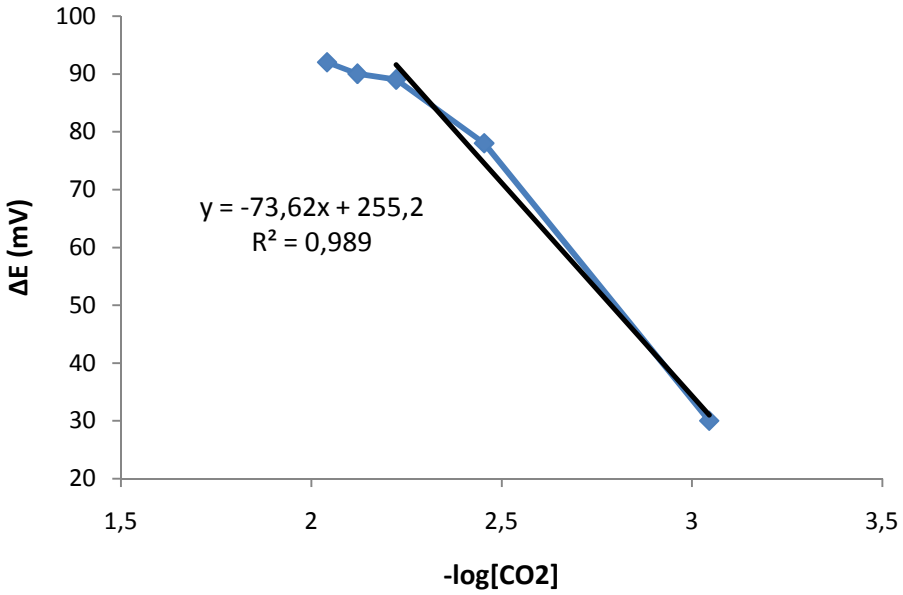

Figura 5.18: Curva de Calibração do Eletrodo de Dióxido de Carbono.

Equação (3): $E(mV) = 73{,}62 \log[CO_2] + 255{,}2$ $R^2 = 0{,}989$

5.6 Medidas envolvendo o Biossensor Microbiano: Analito de Interesse Metanol

Wen e colaboradores (2008) relataram que os poucos biossensores desenvolvidos para metano, utilizando bactérias metanotróficas e sensor de oxigênio, apresentaram baixa sensibilidade e problemas relacionados à

sensibilidade cruzada com o sensor empregado. Desta forma, estes pesquisadores propuseram uma nova configuração de biossensor para metano com o propósito de eliminar os problemas detectados em pesquisas anteriores. Resumidamente, o biossensor para metano, desenvolvido por Wen e seu grupo de pesquisa, consistia num sistema de biosensoriamento microbiano contendo, em seu interior, uma espécie de "rede" de PVA-alginato-ácido bórico, na qual estavam dois micro-organismos metanotróficos imobilizados, um sensor de oxigênio e um medidor. O sistema assim desenvolvido não apresentava os micro-organismos imobilizados diretamente ao transdutor físico (sensor de O_2), mas estavam em conjunto com o mesmo no sistema. O biossensor assim configurado apresentou resposta rápida ao metano e boa reprodutibilidade.

Partindo-se do conhecimento de fatos relacionados à dificuldade no desenvolvimento de um biossensor microbiano para metano, e supondo que as mesmas dificuldades pudessem ser encontradas para o metanol, a ideia inicial do biossensor proposto nesta tese consistiu em utilizar o micro-organismo *Methylosinus trichosporium* OB3b ainda livre, não imobilizado ao transdutor, com a finalidade de verificar sua adaptação nas condições de cultivo empregadas no desenvolvimento desta tese, principalmente quando o meio de cultivo continha biodiesel. Desta forma, considerando que a imobilização do micro-organismo ao sensor de CO_2 poderia acarretar dificuldades na reação bioquímica entre os substratos de estudo e as enzimas constituintes do micro-organismo, enzimas estas responsáveis por todo o processo de oxidação microbiológica, até a produção do produto final, CO_2, a bactéria *Methylosinus trichosporium* OB3b foi utilizada de forma livre no meio de cultivo, sendo o projeto portanto preliminar para desenvolvimento do biossensor em questão.

Nesta etapa, os ensaios foram realizados de modo semelhante aos conduzidos anteriormente, entretanto alíquotas do meio de crescimento foram coletadas para serem realizadas leituras da DO_{600} com a finalidade de verificar se ocorria a produção de material celular e para serem efetuadas medidas com o sensor de dióxido de carbono, sendo que o procedimento para utilização do sensor de CO_2 ocorreu segundo as etapas especificadas no item 4.12.2, o qual

constava de três medidas: A, B e C (Figura 4.7 do Capítulo Material e Métodos).

Embora, no item 5.4.3, chegou-se à conclusão que a concentração inicial de inóculo de 0,055 g/L seria a concentração na qual ocorreria maior formação do CO_2 resultante da oxidação microbiológica de metanol por *Methylosinus trichosporium* OB3b, nesta etapa, para efeito de comparação e discussão, os ensaios também foram realizados para a concentração de inóculo de 0,110 g/L. Os resultados que foram obtidos encontram-se registrados nos itens descritos a seguir.

5.6.1 Resultados para concentração inicial de inóculo de 0,110 g/L

Para a concentração de inóculo de 0,110 g/L, foram avaliadas duas condições: uma contendo metanol a 0,25% (v/v) e outra contendo biodiesel a 50% (v/v). Em ambos os casos o pH do meio de crescimento foi 5.0. As Figuras 5.19 e 5.20 mostram os perfis de crescimento obtidos.

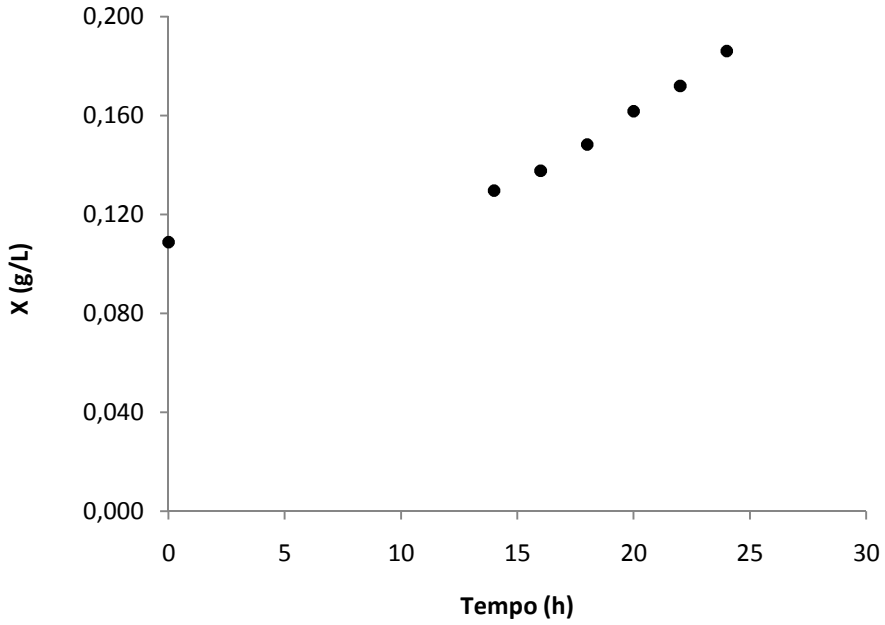

Figura 5.19: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e metanol a 0.25 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

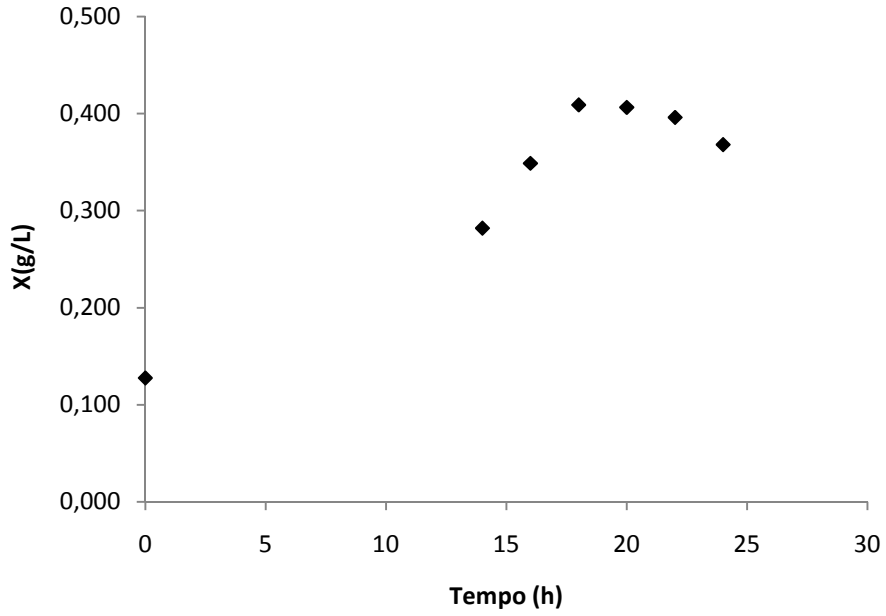

Figura 5.20: Crescimento Celular para X_o= 0,110 g/L e biodiesel a 50 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

Considerando as medidas realizadas com o eletrodo de CO_2, não houve variação do potencial elétrico, em nenhum intervalo de tempo analisado, na condição em que o micro-organismo foi cultivado na presença de metanol a 0,25% (v/v) sem o biodiesel (Figura 5.19). Entretanto, o mesmo não ocorreu para o caso em que o cultivo de *M. trichosporium* OB3b foi realizado na presença de biodiesel a 50 % (v/v).

Para a condição onde foi empregado no meio de cultivo apenas metanol, em concentração de 0.25% (v/v), o eletrodo de CO_2 não detectou a formação de dióxido de carbono, o que não significa dizer que isto não ocorreu. Neste ponto, cabe salientar que segundo Whittenbury *et al*. (1970), o metanol pode ser tóxico aos micro-organismos metanotróficos quando presente no meio, mesmo em concentrações baixas. Embora tenha sido percebido, através da Figura 5.19, que houve produção de biomassa ao longo do tempo, a via de oxidação do metanol para a formação de dióxido de carbono pode ter sido reprimida pela presença de metanol no meio de cultivo.

Comparando-se os resultados ilustrados nas Figuras 5.19 e 5.20, nota-se que para a condição de Xo = 0,110 g/L e biodiesel a 50% (v/v), a produção de material celular foi significativamente maior. Para esta mesma condição, o eletrodo de CO_2 foi capaz de detectar a formação de dióxido de carbono. Uma possível hipótese que poderia explicar tal observação pode estar consolidada no fato de que o micro-organismo oxidou o metanol presente no biodiesel e outra substância que atuou como interferente. Uma explicação plausível para esta observação estaria apoiada no fato de que a enzima metano mono-oxigenase (MMO), encontrada nas bactérias metanotróficas, apresenta reatividade incomum e amplo espectro de substratos (JIANG *et al*., 2010). Pesquisa mais detalhada deve ser realizada no sentido de verificar se a enzima MMO oxidaria, por exemplo, compostos que se encontram, mesmo em baixa concentração, no biodiesel, entre eles o glicerol e um ácido graxo remanescente1 da reação de transesterificação, a dióxido de carbono, ou então se na via metabólica das bactérias metanotróficas há uma etapa na qual ocorra a produção de CO_2 por outra enzima que não a MMO. Portanto, considerando verdadeira tal premissa, a bactéria *M. trichosporium* OB3b não seria de interesse na construção do biossensor microbiano para detecção de metanol em biodiesel, uma vez que a mesma não seria seletiva para o analito de interesse (metanol).

A Tabela 5.3 mostra os resultados de concentração, em mol/L e em g/L, de dióxido de carbono, obtidos com o auxílio da curva de calibração (Equação 3), resultantes das leituras do potencial elétrico no intervalo de tempo avaliado. A medida da leitura no tempo inicial se refere à **leitura A** (água deionizada + tampão). Para o cálculo da concentração de dióxido de carbono, foram utilizados os valores de ΔE (mV), determinados através da diferença entre a **leitura C** (água deionizada + tampão + amostra) e a **leitura A**.

Tabela 5.3: Potencial elétrico e concentração de CO_2 obtida para Xo = 0,110 g/L e biodiesel a 50 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

t(h)	Leitura	ΔE (mV)	$[CO_2]$ (mol/L)	CO_2 (mg/L)
0	-117	0	-	-
14	-115	2	$3{,}64.10^{-4}$	16,0
16	-103	14	$5{,}29.10^{-4}$	23,3
18	-95	22	$6{,}80.10^{-4}$	29,9
20	-83	34	$9{,}89.10^{-4}$	43,5
22	-78	39	$1{,}16.10^{-3}$	50,9
24	-71	46	$1{,}44.10^{-3}$	63,4

A Figura 5.21 mostra, comparativamente, a concentração de biomassa e de dióxido de carbono durante o intervalo de tempo de 24 horas para a condição aqui avaliada.

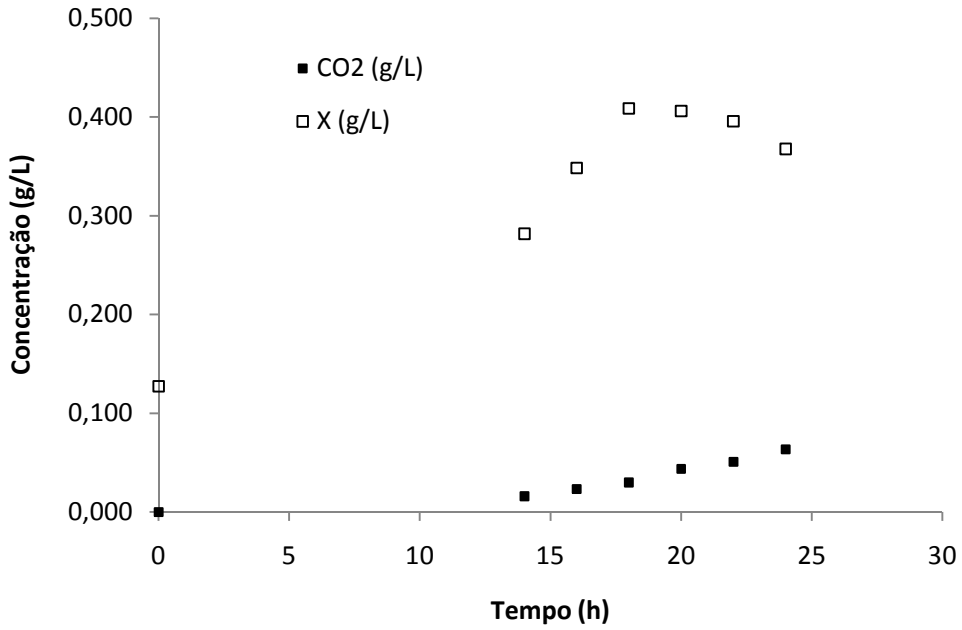

Figura 5.21: Relação entre as concentrações de biomassa e de dióxido de carbono (X_o= 0,110 g/L; biodiesel a 50 % (v/v); pH = 5.0; T = 30ºC).

5.6.2 Resultados para concentração inicial de inóculo de 0,055 g/L

Para a concentração de inóculo de 0,055 g/L, foram avaliadas as seguintes condições: metanol a 0,25% (v/v), biodiesel a 50%, 40% e 20% (v/v). O pH do meio de crescimento foi 5.0. As Figuras 5.22 a 5.25 mostram os perfis de crescimento obtidos para cada um dos casos

.

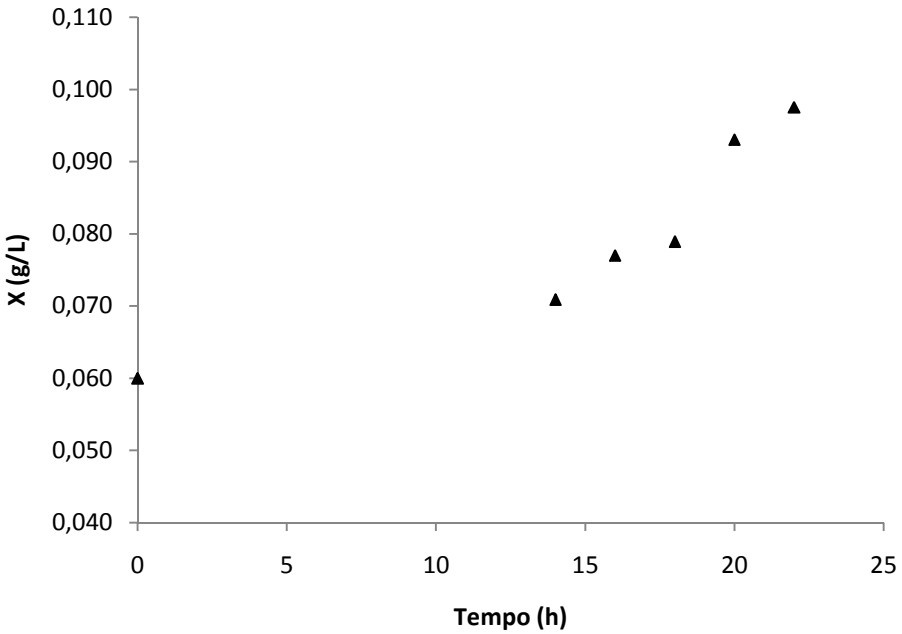

Figura 5.22: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e metanol a 0.25% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

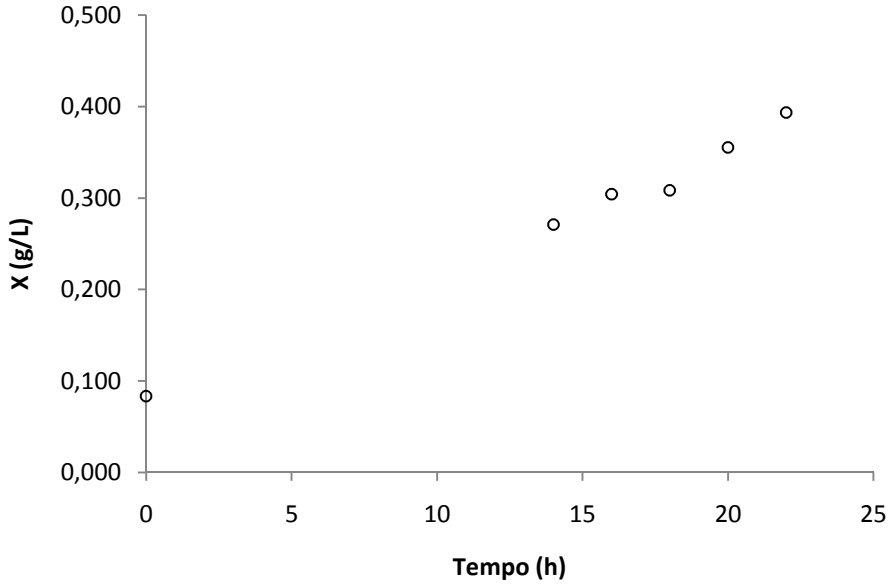

Figura 5.23: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e biodiesel a 50% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

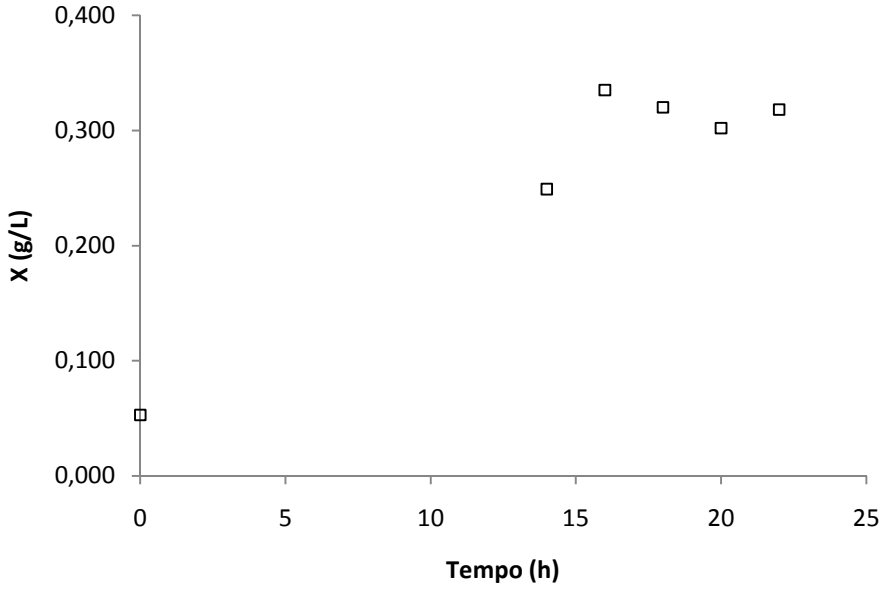

Figura 5.24: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e biodiesel a 40% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

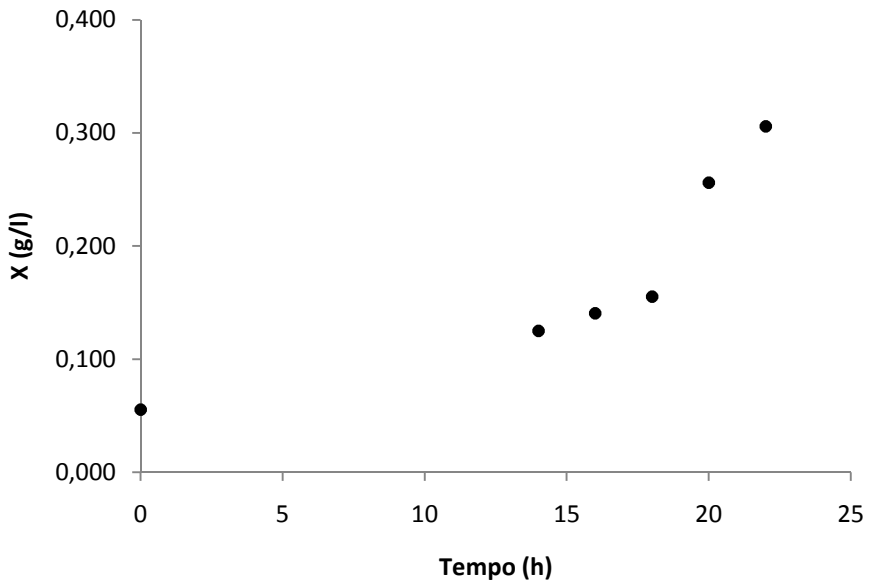

Figura 5.25: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e biodiesel a 20% (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

Para as leituras do potencial elétrico efetuadas com o eletrodo de CO_2, não houve variação do potencial, em nenhum intervalo de tempo analisado, nas condições em que o micro-organismo foi cultivado na presença de metanol a 0,25% (v/v) (Figura 5.22), em biodiesel a 40% (v/v) (Figura 5.24) e em biodiesel a 20% (v/v) (Figura 5.25). No entanto, para a condição em que o cultivo de *M. trichosporium* OB3b foi realizado na presença de biodiesel a 50 % (v/v), foram detectadas variações no potencial elétrico.

Observações semelhantes àquelas menncionadas para Xo = 0,110 g/L (item 5.6.1) foram aqui obtidas para as condições de cultivo contendo apenas metanol a 0.25% (v/v) e biodiesel a 50% (v/v). Desta forma, pôde-se inferir as mesmas hipóteses citadas anteriormente.

Os ensaios envolvendo concentrações de biodiesel a 40% (v/v) e a 20% (v/v) tiveram o objetivo de verificar se nestas condições os resultados seguiriam a mesma tendência observada para a condição na qual foi utilizado biodiesel a 50% (v/v). Para concentrações inferiores de biodiesel ocorreu a produção de material celular, entretanto o dióxido de carbono gerado não foi detectado pelo

eletrodo nestas concentrações. Considerando que o sensor de dióxido de carbono mede CO_2 em fase aquosa, eventualmente uma parcela do dióxido de carbono gerado pode ter ficado na fase orgânica (biodiesel), não sendo, portanto, possível a sua detecção.

A Tabela 5.4 mostra os resultados de concentração, em mol/L e em g/L, de dióxido de carbono, obtidos com o auxílio da curva de calibração (Equação 3), resultantes das leituras do potencial elétrico no intervalo de tempo avaliado para a condição de cultivo em biodiesel a 50% (v/v).

Tabela 5.4: Potencial elétrico e concentração de CO_2 obtida para Xo = 0,055 g/L e biodiesel a 50 % (v/v) (pH = 5.0; T = 30ºC).

t(h)	Leitura	ΔE (mV)	$[CO_2]$ (mol/L)	CO_2 (mg/L)
0	-93	0	-	-
14	-92	1	$3{,}52.10^{-4}$	15,5
16	-81	12	$4{,}97.10^{-4}$	21,9
18	-67	26	$7{,}70.10^{-4}$	33,9
20	-57	36	$1{,}05.10^{-3}$	46,3
22	-45	48	$1{,}53.10^{-3}$	67,4

Para efeito de comparação, a Figura 5.26 mostra a concentração de biomassa produzida e de CO_2 durante o período de estudo de 22 horas.

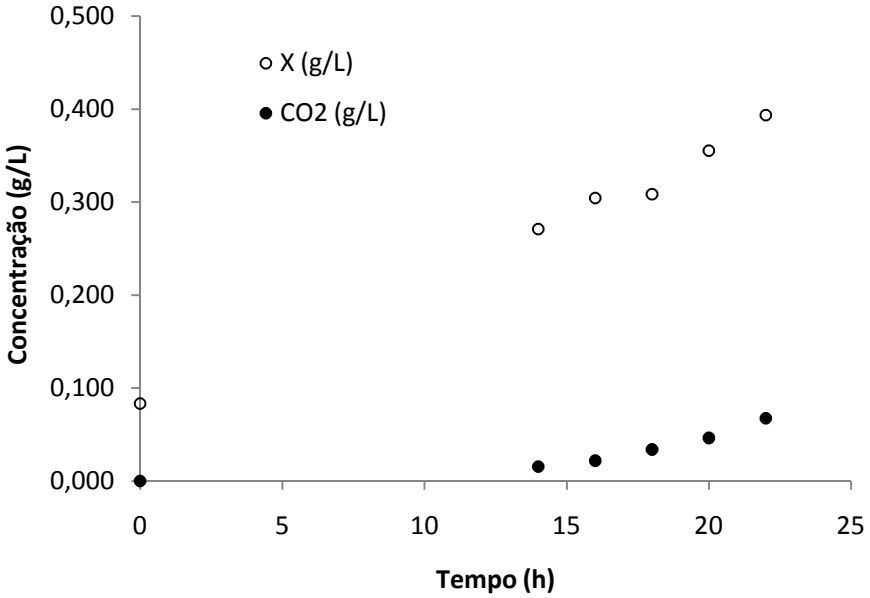

Figura 5.26: Relação entre as concentrações de biomassa e de dióxido de carbono (X_o= 0,055 g/L; biodiesel a 50 % (v/v); pH = 5.0; T = 30ºC).

5.7 Medidas envolvendo o Biossensor Microbiano: Analito de Interesse Metano

Partindo-se de resultados preliminares envolvendo a oxidação de metano por *M. trichosporium* OB3b, nesta etapa procurou-se avaliar a possibilidade de crescimento do micro-organismo em meio contendo gás natural veicular como fonte de metano (substrato).

Anteriormente à realização do crescimento bacteriano, o Gás Natural Veicular empregado na realização dos ensaios foi analisado através da técnica de Cromatografia Gasosa com a finalidade de saber os componentes que estavam presente além do metano. O cromatograma resultante da análise do GNV encontra-se registrado a seguir na Figura 5.27.

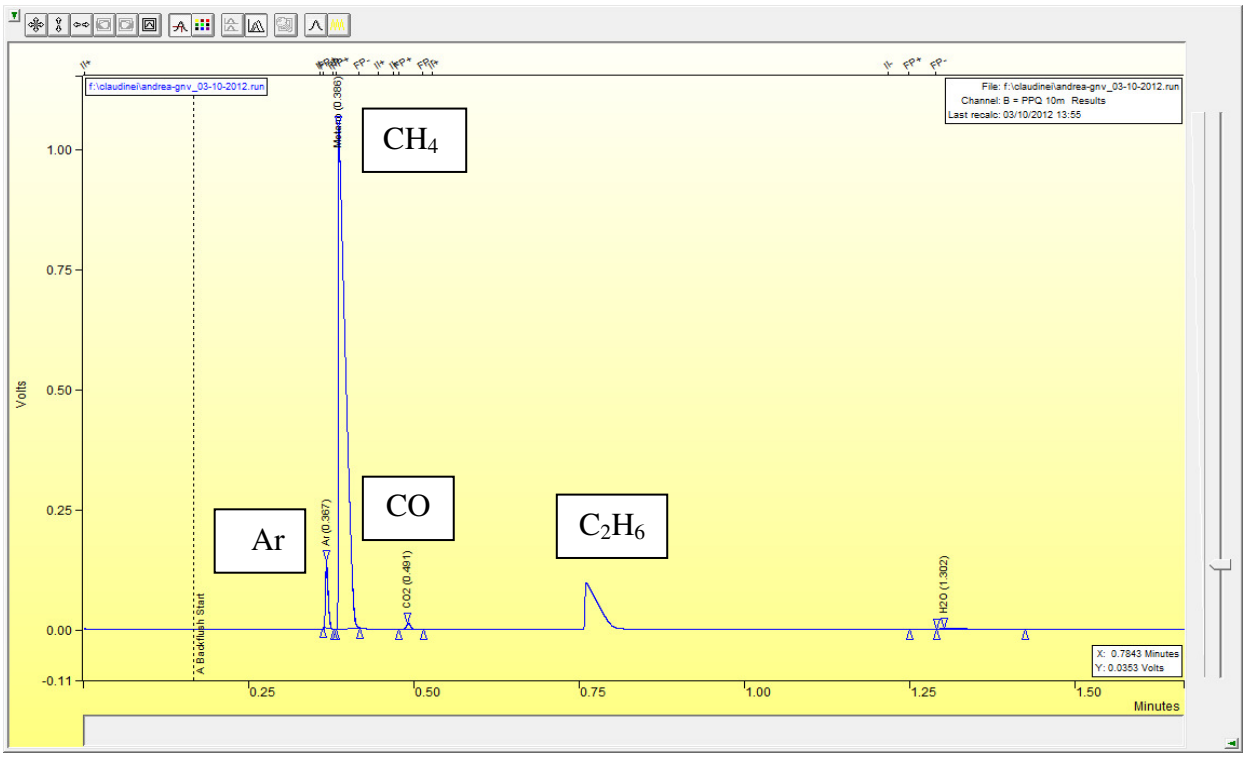

Figura 5.27: Cromatograma Gás Natural

Baseando-se em estudos anteriores (Rodrigues, 2005), nos resultados constantes no item 5.4.1 e tendo metano como componente presente em grande proporção no Gás Natural, o procedimento experimental foi realizado empregando-se um volume de 40 mL de Gás Natural e concentração inicial de inóculo de 0,055 g/L. Entretanto, o pH do meio não foi alterado, uma vez que resultados não satisfatórios foram obtidos quando o pH de meio foi reduzido a 5.0 (Rodrigues, 2005).

O crescimento celular foi acompanhado durante um período de 60 horas através das medidas de DO_{600}, sendo a primeira alíquota recolhida no tempo inicial (0h), a segunda alíquota em 12 horas e as demais em intervalos de seis em seis horas. Paralelamente, alíquotas do meio de cultivo foram colhidas e levadas ao eletrodo de dióxido de carbono para a leitura do potencial elétrico em mV. Os resultados encontram-se registrados na Figura 5.28.

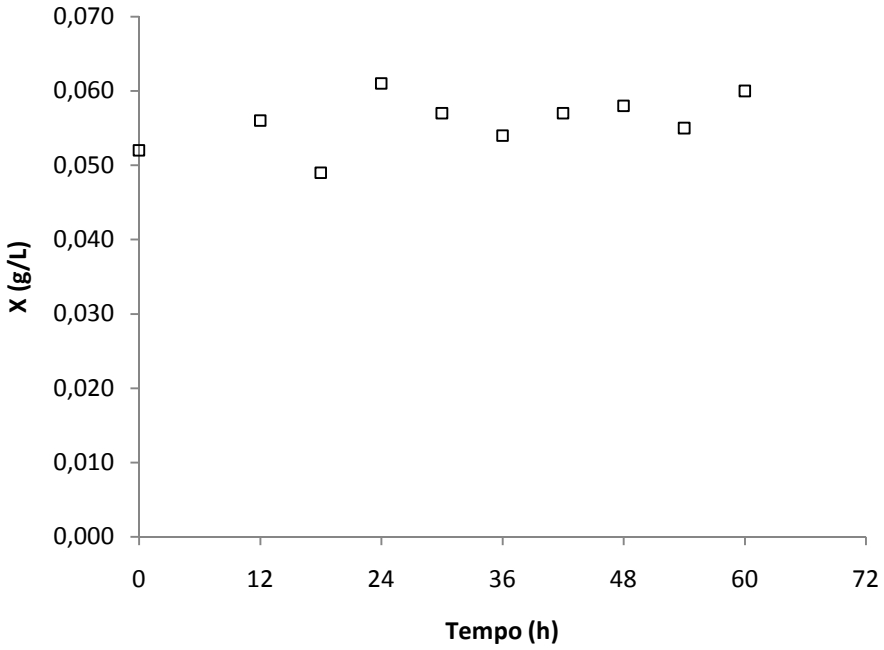

Figura 5.28: Crescimento Celular para X_o= 0,055 g/L e 40 mL de Gás Natural (pH = 6.5; T = 30ºC).

Para o ensaio em questão, não foi observado crescimento celular significativo durante o tempo de incubação analisado, como também não ocorreram mudanças nas medidas dos potenciais elétricos fornecidos pelo eletrodo de dióxido de carbono.

Com a finalidade de compreender os resultados observados, tentou-se buscar, na literatura científica, dados que justificassem que a presença de fontes de carbono diferentes do metano, no caso em questão o dióxido de carbono e o etano, poderiam influenciar de forma negativa o crescimento de *M. trichosporium* OB3b no gás natural. Segundo Park *et al* (1991), a presença de dióxido de carbono (na forma gasosa ou na forma de bicarbonato) em um biorreator faz com que ocorra uma redução no tempo de duração da fase lag de *M. trichosporium* OB3b e um aumento na concentração final de células. Esta observação não corroborou com os dados obtidos e ilustrados na Figura 5.28.

Whittenbury *et al*. (1970) estudaram um grande número de cepas de bactérias metanotróficas em *Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria*. Neste trabalho, ensaios contendo etano e metano,

juntos, no meio de crescimento de micro-organismos metanotróficos, entre eles *M. trichosporium* OB3b, mostraram que o etano teve efeito inibitório no processo de oxidação do metano, que foi detectado através da redução da taxa de crescimento dos micro-organismos em meios de cultivo contendo metano como fonte exclusiva de carbono. Tal fato poderia explicar as observações aqui obtidas.

Assim, visando a aplicação do micro-organismo como componente biológico a ser utilizado na confecção de um biossensor microbiano para quantificação de metano em gás natural, é de crucial importância que o mesmo seja capaz de reagir com o analito de interesse. Se na matriz a qual se pretende fazer a quantificação de um analito específico houver uma espécie inibidora que possa dificultar, ou até mesmo impedir a reação entre a espécie de interesse e o micro-organismo, este deixa de ter uma das características desejáveis para sua aplicação como componente biológico na confecção de um biossensor e, no caso aqui avaliado, a bactéria *M. trichosporium* OB3b não foi eficiente na degradação de metano em gás natural (amostra real). Portanto, esta observação passa a ser um fator limitante em sua aplicação na construção do biossensor proposto nesta tese.

5.8 Análise Cromatográfica do Biodiesel Utilizado nos Ensaios de Biodegradação

Para o estudo realizado para concentração inicial de inóculo de 0,055 g/L e biodiesel a 50% (v/v), a temperatura de 30ºC e pH 5.0, duas alíquotas da fase orgânica do meio de crescimento oriundas de diferentes cultivos em batelada, denominadas amostra A e amostra B, contendo cerca 5,0 g de biodiesel cada uma, foram analisadas através da técnica de Cromatografia Gasosa (GC-2010 *Shimadzu*). Os cromatogramas A e B (Figuras 5.30 e 5.31) obtidos para as duas amostras avaliadas foram comparadas ao cromatograma do biodiesel original (Figura 5.29), o qual continha teor de metanol de 0,145% (m/m), de acordo com os dados do fornecedor, e que foi utilizado nos ensaios

em questão. A Tabela 5.5 indica os resultados obtidos pela análise cromatográfica.

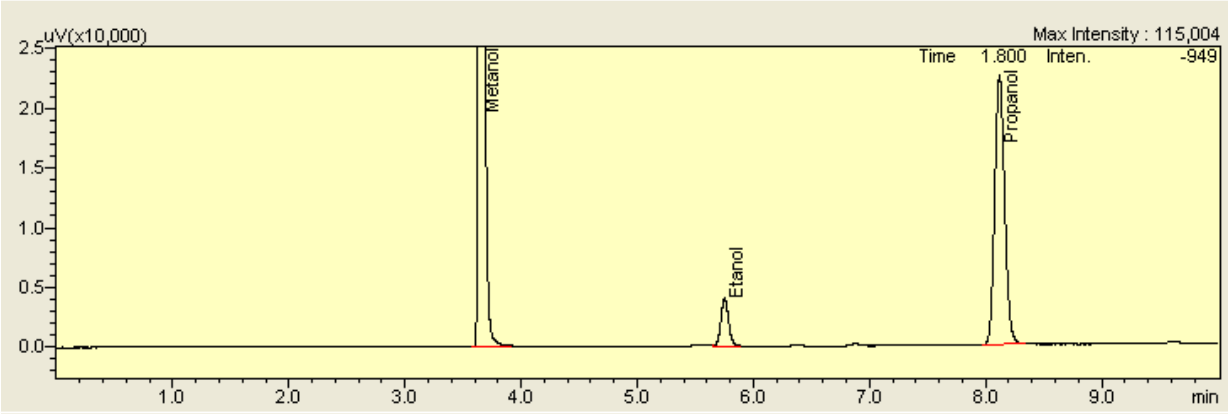

Figura 5.29: Cromatograma do Biodiesel Original.

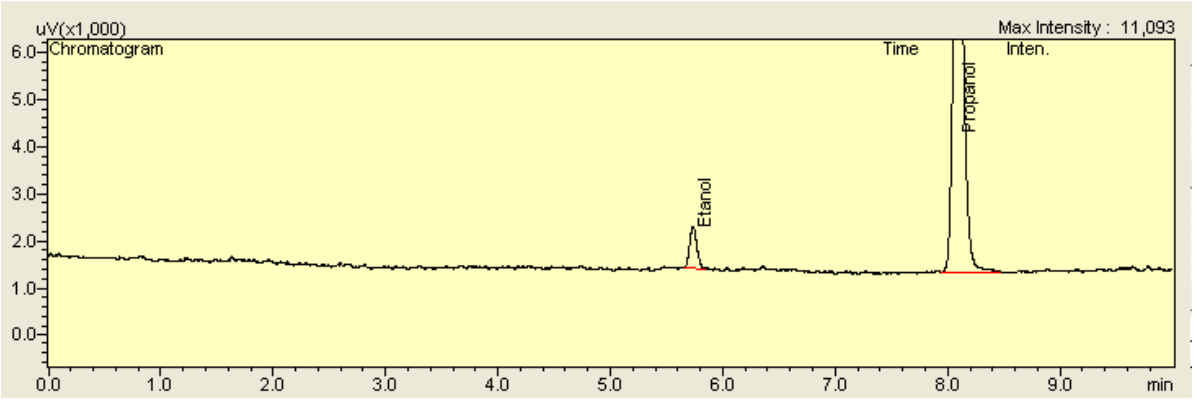

Figura 5.30: Cromatograma da amostra A.

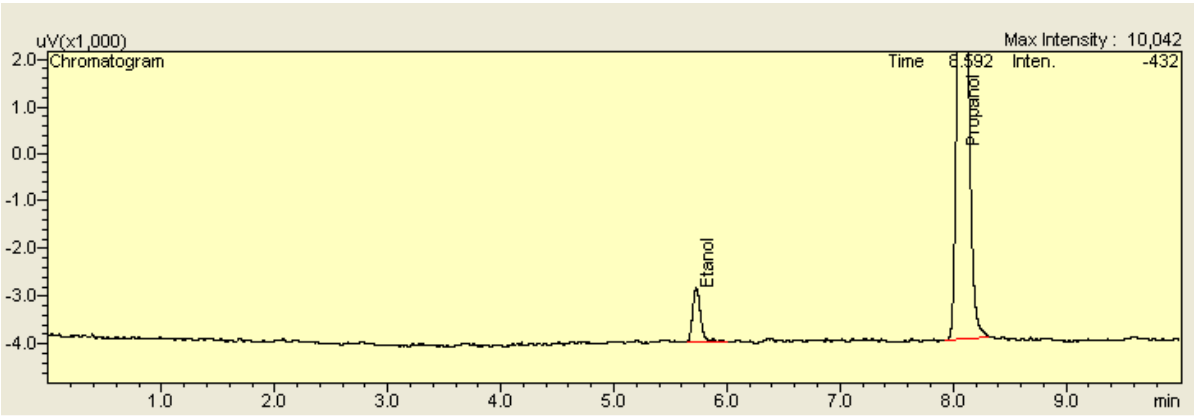

Figura 5.31: Cromatograma da amostra B.

Tabela 5.5: Análise por Cromatografia Gasosa do Biodiesel residual (Xo = 0,055 g/L e biodiesel a 50% (v/v))

	Teor de metanol (g/100g biodiesel)	
Amostra	Antes do ensaio	Após ensaio
A	0,1453*	0,0032
B	0,1453*	0,0031

***** Teor de metanol no Biodiesel original

Avaliando-se o teor de metanol no biodiesel original e nas amostras A e B, provenientes após cultivo celular num período de 22 horas, nota-se que, de fato, o teor de metanol reduziu significativamente. Considerando que o metanol tem maior afinidade pela fase aquosa (meio MSN) do que pelo biodiesel e baseando-se nas observações constantes no item 5.6.2, uma possível hipótese que explicaria os resultados encontrados é que o metanol transferido para a fase aquosa tenha sido utilizado pelo micro-organismo para geração de material celular, vide curva de crescimento representada pela Figura 5.23, e dióxido de carbono, vide resultados medidos pelo sensor de CO_2.

5.8.1 Determinação do Consumo de Metanol

Como o objetivo de comparar os resultados obtidos do biossensor proposto com aqueles encontrados através da técnica analítica de cromatografia gasosa, cálculos foram efetuados com a finalidade de se determinar o quanto de metanol presente no biodiesel foi utilizado para produção de dióxido de carbono na condição de Xo = 0,055 g/L e biodiesel a 50% (v/v), após 22 horas de cultivo. Abaixo, são mostradas as etapas que levaram à determinação da quantidade de metanol consumido.

- ***Consumo de metanol pela técnica cromatográfica***

No ensaio realizado, o meio de cultivo foi formado por 50 mL de biodiesel e 50 mL de meio inorgânico MSN.

Como a análise cromatográfica informa valores em massa (g metanol/100g biodiesel), inicialmente foi determinada a massa de biodiesel correspondente aos 50 mL empregados no ensaio. Para tal foi utilizado o valor de massa específica de 875 kg/m^3 para o biodiesel (valor com referência à resolução ANP nº7/2008). Fazendo-se as conversões de unidades necessárias, a massa de biodiesel foi de 43,75 g.

De acordo com os dados do fornecedor, o percentual, em massa, de metanol no biodiesel, foi de 0,1453% (m/m). Assim, a massa de metanol nos 50 mL do biodiesel foi de 0,06344 g e, como o meio de cultivo, tinha volume de 100 mL, a concentração de metanol no ensaio era de 0,6344 g/L.

Pelos valores constantes na Tabela 5.5 e sabendo-se que 50 mL de biodiesel correspondem a uma massa de 43,75g, as seguintes informações podem ser obtidas:

Tabela 5.6: Teor de metanol obtido pela técnica de cromatografia gasosa (Xo = 0,055 g/L e biodiesel a 50% (v/v))

	Teor de metanol
Antes do ensaio	0,1453 g/100g biodiesel
Após ensaio	0,0032 g/100g biodiesel
Metanol consumido	0,1421 g/100g biodiesel
Metanol consumido	0,062g/43,75g de biodiesel

Sabendo que o meio de cultivo tinha volume de 100 mL, então a quantidade de metanol consumida no meio foi de 0,6204 g/L.

- ***Consumo de metanol pelo biossensor***

Pela Tabela 5.4, a concentração de CO_2, ao final de 22 horas, foi de 0,0674 g/L.

Segundo Whittenbury *et al*. (1970), para cada mol de metanol consumido por pelo micro-organismo metanotrófico, forma-se cerca de 0,55 mol de dióxido de carbono. Desta forma, conhecendo-se a concentração de CO_2 resultante após 22 horas de cultivo, tem-se que a concentração de metanol que foi consumida para geração de CO_2 foi de 0,0891 g/L.

A Tabela 5.7 registra o comparativo de informações obtidas pela técnica de cromatografia gasosa e pelo biossensor.

Tabela 5.7: Comparativo entre as metodologias analíticas.

Técnica	Conc. Inicial de Metanol	Concentração Metanol Consumido
Cromatografia Gasosa	0,6344 g/L.	0,6204 g/L
Biossensor	0,6344 g/L.	0,0891 g/L.

Comparando os valores de concentração de metanol consumido pelas duas técnicas, e baseando-se na estequiometria de crescimento celular, depreende-se que nem todo metanol que foi consumido pelo micro-organismo foi utilizado para geração de dióxido de carbono, grande parte teria sido usada para formação de biomassa, o que justificaria os dados representados na Figura 5.23 onde, ao longo do tempo, a concentração de células aumentou expressivamente. Entretanto, a hipótese de que houve perda de CO_2 até a realização da análise pelo eletrodo é um fator que não pode ser descartado. Assim, para o propósito em questão da utilização do biossensor como método de quantificação de metanol em biodiesel, o protótipo estudado não foi fidedigno para a medição do metanol em virtude da discrepância dos valores obtidos nas duas técnicas.

Outros fatores relevantes que podem ser inferidos dos cálculos aqui realizados são em relação às suposições feitas nos itens 5.6.1 e 5.6.2. A primeira suposição foi o fato de que o metanol poderia agir como inibidor da via metabólica do micro-organismo que leva à formação de CO_2. Comparando a concentração de metanol presente no ensaio para biodiesel a 50% (v/v), concentração esta de 0,6344 g/L, com aquela referente a 0.25% (v/v), a qual corresponde a uma concentração de 1,978 g/L, percebe-se que a primeira é cerca de três vezes inferior à segunda, portanto, isto pode corroborar com o fato de que o metanol pode ter inibido a produção de dióxido de carbono pela bactéria, uma vez que o sensor não detectou a formação de dióxido de carbono.

A segunda suposição foi em relação à hipótese de que o micro-organismo teria assimilado um possível interferente presente no biodiesel. Esta hipótese poderia ser afirmada caso a concentração de metanol quantificada indiretamente pelo sensor de CO_2 fosse maior que a concentração de metanol obtida pelo método da cromatografia gasosa e, como calculado aqui, isto não foi observado.

CAPÍTULO 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 Conclusões

- O micro-organismo *Methylosinus trichosporium* OB3b foi capaz de degradar amostras padrões de metano e de metanol.

- A mudança de pH do meio de cultivo de 6.5 para 5.0, com o propósito do emprego do sensor de dióxido de carbono, realizada nos ensaios empregando o metanol como substrato, não interferiu na capacidade da bactéria em se reproduzir.

- O micro-organismo foi capaz de se adaptar em condições de cultivo contendo biodiesel, independente do meio conter ou não metanol.

- Em amostra de gás natural, o micro-organismo não cresceu, sendo provavelmente a explicação para esta observação a presença do etano que pode ter agido como um inibidor. Desta forma, o biossensor proposto não pode ser empregado na quantificação de metano em amostra de gás natural.

- A determinação da concentração de metanol consumida no ensaio para Xo = 0,55 g/L e biodiesel a 50% (v/v) pela técnica de cromatografia gasosa e pelo uso do biossensor indicou que o protótipo sugerido (biossensor microbiano) não seria um dispositivo analítico fidedigno para quantificação de metanol em biodiesel.

- Para a condição de ensaio contendo concentração de metanol 0.25% (v/v), o sensor não detectou a formação dióxido de carbono. Tal fato foi atribuído à capacidade tóxica do metanol aos micro-organismos metanotróficos, que contribuiu para que a via metabólica de formação de CO_2 não ocorresse.

- A hipótese de que o micro-organismo poderia ter utilizado um possível interferente presente no biodiesel como fonte de carbono foi descartada quando se comparou os resultados da quantidade de metanol consumida

no processo de degradação pela bactéria determinados pela cromatografia gasosa e pela utilização do biossensor.

- No caso da proposta da tese, os resultados obtidos mostraram não ser viável a construção do biossensor microbiano para quantificação de metano e de metanol em amostras reais de gás natural e de biodiesel, respectivamente.

6.2 Sugestões

- No que se refere ao esclarecimento da via metabólica da bactéria *Methylosinus trichosporium* OB3b, sugere-se a realização de cultivos em diferentes concentrações, abaixo do valor de 0.25% (v/v) de metanol para identificar qual a faixa de concentração deste que pode interferir na via de produção de dióxido de carbono.

- Pesquisar e avaliar um transdutor que possa quantificar de forma fidedigna a concentração de metanol em biodiesel utilizando o a bactéria *Methylosinus trichosporium* OB3b.

- Dar continuidade à proposta de se construir um biossensor para metano e para metanol em combustíveis verificando a possibilidade de utilização de um micro-organismo e de um transdutor diferentes dos empregados no desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFAYA, A. A. e KUBOTA, L. T. A Utilização de Materiais Obtidos pelo Processo Sol-Gel na Construção de Biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.

ALHADEFF, E.M., SALGADO, A. M., CÓS, O., Valero, F., PEREIRA JR., N. e VALDMAN, B. Integrated Biosensor Systems for Ethanol Analysis. **Appl Biochem Biotechnol**, v.146, p.129–136, 2008.

ALHADEFF, E.M., SALGADO, A. M., PEREIRA JR., N. e VALDMAN, B. Development and Application of an Integrated System for Monitoring Ethanol Content of Fuels. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 113-116, 2004.

AMARAL, J.A.; ARCHAMBAULT, C.; RICHARDS, S.R. e KNOWLES, R. Denitrification Associated with Groups I and II Methanotrophs in a Gradient Enrichment System. **FEMS Microbiology Ecology**, v.18, p. 1-89-398, 1995.

Anthony, C. 1982. The Biochemistry of methylotrophs. Academic Press, New York. Disponível em: <http://www.chris-anthony.co.uk/pdf_files/Biochemistryofmeths.pdf>. Acesso em novembro de 2010.

ARAUJO, A. R. T. S.; SARAIVA, M. L. M.F.S; LIMA; J. L.F.C; KORNB, M.G.A. Flow methodology for methanol determination in biodiesel exploiting membrane-based extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 177-183, 2008.

ARAÚJO, R. M. “CONTROLE DE QUALIDADE DE BIODIESEL”. SEMINÁRIO TEMÁTICO DE CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE 2005. Superintendência de Qualidade de Produtos. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. 2005. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/ppt/fortaleza/03.pdf>. Acesso em maio de 2007.

ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v.23, n.7, p. 1083-1100, 2008.

BALASUBRAMANIAN, R. e ROSENZWEIG, A. C. Copper methanobactin: a molecule whose time has come. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p.245–249, 2008.

BARROCAS, P. R. G.; VASCONCELLOS, A. C. S.; DUQUE, S. S.; SANTOS, L.M.G.; JACOB, S. C.; LAURIA- FILGUEIRAS, A. L.; MOREIRA, J. C. Biossensores para o monitoramento da exposição a poluentes ambientais. **Cad. Saúde Colet**., v. 16, n. 4, p. 677-700.

BEGONJA, A. e HRSAK, D. Effect of Growth Conditions on the Expression of Soluble Methane Monooxygenase. **Food Technol. Biotechnol.**, v.39, n.(1), p.29–35, 2001.

BENEVIDES, M.S.L. **Estudo sobre a Produção de Biodiesel a partir das oleaginosas e análise de modelos cinéticos de processo de transesterificação via catálise homogênea.** 2011. Monografia (Graduação em Ciência e Tecnologia), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Angicos, RN. 2011.

BEST, D. J.; HIGGINS, I. J. Methane-oxidizing Activity and Membrane Morphology in a Methanol- grown Obligate Methanotroph, *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Journal of General Microbiology**, v. 125, p. 13-84, 1981.

BLANCO, J. M., MENDÍA, F., PENÃ, F. Comparative analysis of CO_2 and SO_2 emissions between combined and conventional cycles with natural gas and fuel oil consumption over the Spanish thermal power plants. **Fuel**, v.85, p. 1280–1285, 2006.

BOSSI, A,; PILETSKY, S. A.; RIGHETTI, P. G. e TUNER, A. P. F. Capillary electrophoresis coupled to biosensor detection. **Journal of Chromatography A**, v.892, p. 143–153, 2000.

BUCUR. B.; RADU, G. L.; TOADER, C. N. Analysis of methanol–ethanol mixtures from falsified beverages using a dual biosensors amperometric system based on alcohol dehydrogenase and alcohol oxidase. **European Food Research and Technology**, v. 226, n.6, p. 1135-1342, 2008.

CAVENATI, S., GRANDE, C. A., RODRIGUES, A. E. Separation of $CH_4/CO_2/N_2$ mixtures by layered pressure swing adsorption for upgrade of natural gas. **Chemical Engineering Science**, v.61, p.3893–3906, 2006.

CHANG, C.L., CHENA, C. Y., SUNG, C. C., LIOU, D. H. Fuel sensor-less control of a liquid feed fuel cell system under steady load for portable applications. **Journal of Power Sources**, v. 164, p. 606–613, 2007.

CHEN, R. e ZHAO, T. S. A novel electrode architecture for passive direct methanol fuel cells. **Electrochemistry Communications**, v.9, p.718–724, 2007.

CHISTOSERDOVA, L.; KALYUZHNAYA, M. G.; LIDSTROM, M. E. The Expanding World of Methylotrophic Metabolism. **Annu Rev Microbiol**.v.63, p. 477-499, 2009.

COADE, R., COLDHAM, D. The interaction of mercury and aluminium in heat exchangers in a natural gas plants. **International Journal of Pressure Vessels and Piping**, p.1-7, 2006.

CONROY, P. J.; Hearty, S.; Leonard, P.; O'Kennedy, R. J. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, p. 10-26, 2009.

CONROY, P.J.; HEARTY, S.; RICHARD, P.L.; O'KENNEDY; J. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, p. 10-26, 2009.

CORNISH, A.; NICHOLLS, K. M.; HUNTER, B. K.; ASTON, W. J., HIGGINS, I. J. e SANDERS, K. M. In vivo ^{13}C NMR investigations of methanol oxidation by the obligate methanotroph Methylosinus trichosporium OB3b. **Journal of General Microbiology**, v.130, p.2565-2575, 1984.

COSTA NETO, P. R., ROSSI, L. F. S., ZAGONEL, G. F., RAMOS, L. P. Produção de Biocombustível Alternativo ao Óleo Diesel Através da Transesterificação de Óleo de Soja Usado em Frituras. **Química Nova**, v.23, n.4, p.531-537, 2000.

D'SOUZA, S. F. Microbial biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**. v. 16, p. 337-353, 2001.

DALTON, H. The Leeuwenhoek Lecture 2000 the natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria, **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol**.,v.360, p.1207–1222, 2005.

DAMGAARD, L. R. e REVSBECH, N. P. A Microscale Biosensor for Methane Containing Methanotrophic Bacteria and an Internal Oxygen Reservoir. **Anal. Chem**., v. 69, n.13, p. 2262–2267, 1997.

DAMGAARD, L. R.; REVSBECH, N. P. e REICHARDT, W. Use of an Oxygen-Insensitive Microscale Biosensor of Methane to Mesure Methane Concentration Profiles in a Rice Paddy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.3, p.864-870, 1998.

DERMIBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels**. Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 14–34, 2009.

DHAWAN, G., SUMANA, G., MALHOTRA, B.D. Recent developments in urea biosensors. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p.42–52, 2009.

DIANOU, D. e ADACHI , K. Characterization of methanotrophic bacteria isolated from a subtropical paddy field. **FEMS Microbiology Letters**, v.173, p.163-73, 1999.

DONG, S. e CHEN, X. Some new aspects in biosensors. **Reviews in Molecular** *Biotechnology*, v.82, p. 303-323, 2002.

DORONINA, N. V., EZHOV V. A. e TROTSENKO, YU. A. Growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b on Methane and Poly-β-Hydroxybutyrate

Biosynthesis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 182-185, 2008.

DU, P.; ZHOU, B.; CAI, C. Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue A nanocomposite modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 614, p. 149–156, 2008.

DUAN, C.; LUO, M.; XING, X. High-rate conversion of methane to methanol by *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Bioresource Technology**, v.102, n.15, p.7349–7353, 2011.

FARIAS, L. M., SELLITTO, M. A. Uso da energia ao longo da história: evolução e perspectivas futuras. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 12, n. 17, p. 01-106, 2011.

FARRÉ, M., KANTIANI, L., PÉREZ, S., BARCELÓ, D. Sensors and biosensors in support of EU Directives. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 28, No. 2, 2009.

FATIBELLO-FILHO, O.; SULEIMAN, A.; GUILBAULT, G. G. Enzyme electrode for the determination of aspartate. **Biosensors**. v. 4, n. 5, p.313–321, 1989.

FERRARI, R. A., OLIVEIRA, V. S., SCABIO, A. Biodiesel de Soja – Taxa de Conversão em Ésteres Etílicos, Caracterização Físico-Química e Consumo em Gerador de Energia. **Química Nova**, v.28, p.19-23, 2005.

FERRINI, A.M.; MANNONI, V.; CARPICO, G; PELLEGRINI, G.E. Detection and identification of beta-lactam residues in milk using a hybrid biosensor. **J Agric Food Chem**., v. 56, p.784-788, 2008.

FURUTO, T.; TAKEGUCHI, M. e OKURA, I. Semicontinuous methanol biosynthesis by *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Journal of Molecular** *Catalysis A*: *Chemical*, v.144, p.257-261, 1999.

GERARD, M.; CHAUBEY, A. e MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biossensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v.17, p.345-359, 2002.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1097– 1107, 2005.

GHESTI,G. F.; MACEDO, J. L.; DIAS, J.A.;.DIAS; S. C. L. Produção de biodiesel via transesterificação etílica com zeólitas básicas. **Quím. Nova** v.35, n.1, p. 119-123, 2012.

GORIUSHKINA, T. B., SHKOTOVA, L.V., GAYDA, G. Z., KLEPACHC, H. M., GONCHARC, M. V., SOLDATKINA, A. P., DZYADEVYCHA, S.V. Amperometric

biosensor based on glycerol oxidase for glycerol determination. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 2009.

HANASHI, T.; YAMAZAKI, T.; TSUGAWA, W.; FERRI, S.; NAKAYAMA, D.; TOMIYAMA, M.; IKEBUKURO, K.; SODE, K. BioCapacitor – A novel category of biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v.24, n.7, p. 1837-1842, 2009.

HANSON, R. S. e HANSON, T. E. Methanotrophic Bactéria. **Microbiology Reviews**, v.60, n.2, p.439-471, 1996.

JACOBY, G.; DE PAULA, L.A.S. **O Estado da Ciência do Desenvolvimento de Biossensores a Nível Nacional**. Monografia (Graduação em Engenharia de Bioprocessos. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2012.

JIANG, H.; CHENB, Y.; JIANG, P.; ZHANG, C.; SMITHC, T.J.; MURRELL, J.C.; XINGA, X. H. Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 277-288, 2010.

KATRLÍK, J., MASTIHUBA, V., VOSTIAR, I., SEFCOVICOVÁ, J., STEFUCA, V., GEMEINER, P. Amperometric biosensors based on two different enzyme systems and their use for glycerol determination in samples from biotechnological fermentation process. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, p. 11–18, 2006.

LAWRENCE, N. S. Analytical detection methodologies for methane and related hydrocarbons. **Talanta**. v. 69, p. 385-392, 2006.

LEI, Y., WILFRED, C., MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, p. 200–210, 2006.

LIEBERMAN, R. L; ROSENZWEIG, A.C. Biological methane oxidation: regulation, biochemistry, and active site structure of particulate methane monooxygenase. **Crit Rev Biochem Mol Biol**. v.39, p.147-64, 2004.

LIU, Q.; KIRCHHOFF, J. R. Amperometric detection of methanol with a methanol dehydrogenase modified electrode sensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 601, p. 125-131, 2007.

LÔBO, I.P.; FERREIRA, S.L.C; CRUZ, R.S. Biodiesel: Parâmetros de Qualidade e Métodos Analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. e PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms. 8ª ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, 1997.

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

MARQUES, M. V., SILVA, C. F. G., NACIUK, F. F. E FONTOURA, L. A. M. A Química, os Processos de Obtenção e as Especificações do Biodiesel. *Revista Analytica*, n. 33, 2008. Disponível em: http://www.revistaanalytica.com.br/analytica/artigos_pdf/33/art07.pdf. Acesso em janeiro de 2009.

MARTIN, H. e MURRELL, J.C**.** Methane monooxygenase mutants of *Methylosinus trichosporium* constructed by marker-exchange mutagenesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.127, p.243-248, 1995.

MAZZEI, T. B. Um Enfoque Logístico para Massificação do Uso do Gás Natural. Projeto de Fim de Curso. Escola Politécnica. UFRJ. 2007.

McDONALD, I.R.; BODROSSY,L.; CHEN, Y.; MURRELL, J. C. Molecular Ecology Techniques for the Study of Aerobic Methanotrophs. Applied and **Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1305–1315, 2008.

MEHRVAR, M. e ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences,** v. 20, p.1113-1126, 2004.

MELLO, L. D. e KUBOTA, L.T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v.77, p.237–256, 2002.

MELLO, P., PELLIZA, G., CATALUÑA, R., DA SILVA, R. Evaluation of the maximum horsepower of vehicles converted for use with natural gas fuel. **Fuel**, 2006.

MELO, A.F. **Produção e Aplicação de Lipase no Desenvolvimento de um Biossensor Potenciométrico**. 2012. 118f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

MOREIRA, L.C.O. **Comparação entre os poluentes atmosféricos e ruídos emitidos por uma caldeira flamotubular movida a gás natural e a óleo combustível BPF 2A**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Campo Grande, MS, 2007.

MURREL, J. C.; MCDONALD, I. R. e GILBERT, B. Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions. **Trends in Mirobiology**, v.8, n.5, p.221-225, 2000.

MURREL, J.C.; RADAJEWSKI, S. Cultivation-independent technique for studying methanotroph ecology**. Microbiological Research**, v. 151, p. 807-814, 2000.

NICOLAIDIS, A. A. e SARGENT, A. W. Isolation of Methane Monooxygenase-Deficient Mutants from Methylosinus trichosporium OB3b Using Dichloromethane. **FEMS Microbiology Letters**, v. 41, p. 47-52, 1987.

ONO, M. e OKURA. I. On the reaction mechanism of alkene epoxidation with *Methylosinus trichosporium OB3b*. **Journal of Molecular Catalysis**, v.61, p.113-122, 1990.

PACHECO-OLIVER, M.; McDONALD, I. R.; GROLEAU, D.; MURREL, C. e MIGUEZ, C.B. Detection of Methanotrophs with Highly Divergent pmoA Genes from Arctic Soils. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, p. 313-319, 2002.

PADDLE, M. B. Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 11, n.11, p. 1079-1113, 1996.

PANT, P.; PANT, S. A review: Advances in microbial remediation of trichloroethylene (TCE). **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 1, p116-126, 2010.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza. 2003. Disponível em <http://www.redebaianadebiocombustiveis.ba.gov.br/arquivo/94.pdf>. Acesso em 7 de maio de 2006.

PARENTE, E.J.S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza-CE: Unigráfica, p. 66, 2003

PELLEGRINI, G.E.; CARPICO, G.; CONI, E. Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 13-18, 2004.

PEREIRA, P. A. P. e ANDRADE, J. B. Fontes, reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera. **Química Nova**, v. 21, p.744-754, 1998.

POUSA, G.P.A.G; SANTOS, A.L.F.;. SUAREZ, PAULO A.Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**. v. 35, n.11, p. 5393–5398, 2007.

RIEDEL, K.; NEUMANN, B.; SCHELLER, F. Microbial sensor based on respiration measurements", **Chem Ing. Tech**., v.64, p. 518-528, 1992.

RODRIGUES, A. S. Estudos de Biodegradação de Metano por *Methylosinus trichosporium* OB3b para Uso Potencial e Biossensor. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química.Univerdade Federal do Rio de Janeiro. 2005.

RODRIGUES, A.S.; VALDMAN, B.; SALGADO, A.M. Analysis of methane biodegradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Braz. J. Microbiol**., v.40, n.2, p. 301-307, 2009.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURAN, N. e KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v.24, n.1, p. 77-86, 2001.

SACHS, I. A revolução energética do século XXI. **Estudos Avançados,** v. 21, n. 59, 2007.

SANTOS, E. M.; FAGÁ, M. T. W.; BARUFI, C. B.; POULALLION, P. L. Gás natural: a construção de uma nova civilização. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 59, 2007.

Santos, J. R. J.; **Biodiesel de babaçu: avaliação térmica, oxidativa e misturas binárias.** 2008. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2008.

SANTOS, M. A., MATAI, P. H. L. S. **Aspectos Técnicos e Ambientais Relativos ao Uso de Biodiesel em Motores de Combustão**. INTERFACEHS – *Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente,* v.3, n.1, 2008. Disponível em: <http://www.interfacehs.sp.senac.br/images/artigos/108_pdf.pdf>. Acesso em jeiro de 2009.

SEKI, Y.; SHIMODA, M.; SUGIMORI, D. e OKURA, I. Epoxidation of allyl compounds with *Methylosinus trichosporium* OB3b: stereoselectivity of methane monooxygenase. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 87, p.17-19, 1994

SHIMODA, M.; SEKI, Y.e OKURA, I. Oxidation of allyl compounds with *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Journal of Molecular Catalysis**, v.78, p.27-30, 1993a.

SHIMODA, M.; SEKI, Y.e OKURA, I. Oxidation of halogenated propanes with *Methylosinus trichosporium OB3b*. **Journal of Molecular Catalysis**, v.83, p.5-10, 1993b.

SILVA, L.M.C. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental**. 2012. 154f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica. Ed. Pioneira, São Paulo. 2005.

SONDERER, T. **Copper Acquisition by Methanotrophic Bacteria**. Swiss Federal Institute of Technology Zurich. December, 2007. Disponível em: < http://www.up.ethz.ch/education/term_paper/termpaper_hs07/SONDERER_rev_termpaper_hs07.pdf>.Acesso em março de 2009.

SOE, C. M. M.; Biomimetic Modeling of the Active Site of Soluble Methane Monooxygenase Hydroxylase (sMMOH). Honors Thesis Collection, p. 1-45, 2012.

SPEITEL, G. E.; THOMPSON, R. C. e WEISSMAN, D. Biodegradation Kinetics of Methylosinus Trichosporium OB3b at Low Concentrations of Chloroform in the Presence and Absence of Enzyme Competition by Methane. **Wat. Res.**, v. 27, n.1, p. 5-24, 1993.

SU, L.; JIA, W., HOUB, C., LEIA, Y. Microbial biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v.26, p. 1788-1799, 2011.

SULLIVAN, J. P.; DICKINSON, D. e CHASE, H. A. Methanotrophs, *Methylosinus trichosporium* OB3b, sMMO, and Their Application to Bioremediaton. **Critical Reviews in Microbiology**, v.24, n.4, p.335-373, 1998.

THEISEN, A.R.; ALI, M. H.; RADAJEWSKI, S.; DUMONT, M. G.; DUNFIELD, P. F.; MCDONALD, I. R.; DEDYSH, S. N.; MIGUEZ, C. B.; MURRELL, J.C. Regulation of methane oxidation in the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2. **Molecular Microbiology**, v.58, n.3, p. 682–692, 2005.

THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A. e WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v.16, p. 121-131, 2001.

TOHJIMA, Y. e WAKITA, H.; Development of a Continuous Measurement System and Areal Distribution of Methane in Some Source Areas. **Applied Geochemistry**, v.9, p.141-146, 1994.

VELASCO-GARCIA, M. N. e MOTTRAM, T. Biosensor Technology Adressing Agricultural Problems. **Biosystems Engineering**, v.84, n.1, p.1-12, 2003.

WATANABE, K**.** Linking Genetics, Physiology and Ecology: an Interdisciplinary Approach for Advancing Bioremediation. **Journal of Bioscience and Boengineering**, v.94, n.6, p.557-562, 2002.

WEN, G.; ZHENG, J.; ZHAO, C.; SHUANG, S.; DONG, CHUAN; CHOI, M. M. F. A microbial biosensing system for monitoring methane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 3, 2008.

WHALEN, S. C. Biogeochemistry of Methane Exchange between Natural Wetlands and the Atmosphere. **Environmental Engineering Science**, v.22, n.1, p.73-93, 2005.

WHITTENBURY, R.; PHILLIPS, K. C. e WILKINSON, J. F. Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria. **Journal of General Microbiology**, v.61, p.205-218, 1970.

WILLE, V. B. CONSIDERAÇÕES ECONOLÓGICAS DO GÁS NATURAL VEICULAR. Curitiba, 2005. Disponível em: <http://www2.pucpr.br/educacão/graduacao/cursos/ccet/engambiental/tcc/2005/vanessa_wille.pdf> Acesso em maio de 2007.

WU, X. J.; CHOI, M. M. F.; CHEN, C. S.; WU, X. M. On-line monitoring of methanol in n-hexane by an organic-phase alcohol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v.22, n. 7, p. 1337-1344, 2007.

XING, X. H., WU, H., LUO, M. F., WANG, B. P**.** Effects of organic chemicals on growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, p. 113-117, 2006.

YANG, W. M.; CHOUB,S. K. e SHUA, C. Effect of current-collector structure on performance of passive micro direct methanol fuel cell. **Journal of Power Sources,** v. 164, p. 549–554, 2007.

YU, Y.; RAMSAY, J. A.; RAMSAY, B. A. Production of soluble methane monooxygenase during growth of Methylosinus trichosporium on methanol. **Journal of Biotechnology**, v. 139, n. 1, p. 78-83, 2009.

ZANGH, S.; WRIGHT, G. e YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction**. Biosensors & Bioelectronics**, v. 15, p. 273-282, 2000.