

Copyright 2005, Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás - IBP

Este Trabalho Técnico Científico foi preparado para apresentação no 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, a ser realizado no período de 2 a 5 de outubro de 2005, em Salvador. Este Trabalho Técnico Científico foi selecionado e/ou revisado pela Comissão Científica, para apresentação no Evento. O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pelo IBP. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões do Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás, Sócios e Representantes. É de conhecimento e aprovação do(s) autor(es) que este Trabalho será publicado nos Anais do 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE E DIVERSIDADE METABÓLICA DO CONSÓRCIO BACTERIANO ISOLADO DO BIOFILME DO TALO DA ALGA *CAULERPA RACEMOSA* (FORSSKÅL), COLETADA NA PRAIA DO FORNO, BÚZIOS, RIO DE JANEIRO.

Bitencourt, J. A.P.¹, BARCELOS, M. A.¹, Guerra, L. V.¹, SAVERGNINI, F.¹, CRAPEZ, M. A. C.

¹ Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha.
Caixa postal: 100.644, CEP 24.001-970, Niterói, RJ. E-mail: jbitencourt@gmail.com.

Resumo – Derrames de petróleo tem se tornado constante, necessitando de medidas alternativas de recuperação dos danos ambientais. Os biosurfactantes apresentam capacidade em dispersar o petróleo na água, tornando-o miscíveis em água e/ou sedimento, possibilitando-o a ser degradado pelos microrganismos locais. Este trabalho tem como objetivo aferir a emulsificação dos hidrocarbonetos de petróleo pelo consórcio e caracterizar a sua diversidade nutricional. O consórcio foi isolado e bioamplificado do biofilme do talo da alga *Caulerpa racemosa* (Forskål). Foram analisados a taxa de emulsificação (TE₂₄%), emulsificação na fase aquosa (B) e não aquosa (A), tensão superficial (TS), carbono bacteriano (CB) com substratos gasolina, querosene e árabe-leve, e a nutrição carbonatada (NC) com substratos ácido aspártico, lactose, ácido benzóico, oxalato de amônio, citrato, glicose, galactose, histidina, árabe leve. Todos os testes passaram por acompanhamento de 0, 7, 15, 30 e 60 dias, com exceção da TS, com 7 e 15 dias. Todos os hidrocarbonetos foram emulsionados, a TS foi reduzida em ambas as amostras, o CB foi reduzido do tempo 15 aos 60 dias e a NC foi positiva para ambos os substratos. Os resultados demonstraram a capacidade deste consórcio em utilizar petróleo como fonte de carbono e produção concomitante de substâncias com atividade surfactante.

Palavras-Chave: Biosurfactante; emulsificação; consórcio bacteriano; diversidade metabólica; petróleo .

Abstract – Oil spills have become constant, needing alternative measures of recovery of the ambient damages. The biosurfactant present capacity in exhausting the oil in the water, making it possible to degraded oil *in situ*, by local microorganisms. This work has many objectives, such as observation of emulsification of hydrocarbons and characterizing nutritional diversity of this bacterial trust. It was bioamplificated of Algae stem biofilm of *Caulerpa racemosa* (Forskål. It had been analyzed the emulsification tax (TE₂₄%), emulsification in the watery (b) and not watery phase (A), superficial tension (TS), bacterial organic carbon (CB) with substrate gasoline light arabic oil and kerosene, nutritional diversity (NC) with substrata aspartic acid, lactose, benzoic acid, ammonium oxalate, citrate, glucose, galactose, histidin, light arabic oil. All the tests had passed for accompaniment of 0, 7, 15, 30 and 60 days, with exception of the TS, with 7 and 15 days. All the hydro-carbons had been emulsified, the TS was reduced in both the samples, the CB was reduced of time 15 to the 60 days and the NC was positive for both substrates. The results had demonstrated the capacity of this trust in using oil as carbon source and concomitant substance production with surfactant activity.

Keywords: Biosurfactant; emulsification, bacterial trust; metabolic diversity; oil.

1. Introdução

O petróleo é formado por uma ampla e complexa gama de substâncias inorgânicas e orgânicas, extremamente influenciadas por condições físico-químicas, biológicas e geológicas do ambiente em que ele foi formado (Marques Junior *et al.*, 2002). Dentre as substâncias mais comuns encontramos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), carcinogênicos, tendem a se acumular em moléculas lipofílicas, bem como interagir com constituintes hidrofóbicos da membrana celular, provocando a perda da integridade e o caráter de barreira seletiva da membrana plasmática. Podendo acarretar disfunções variadas (Libes, 1992; Crapez, 2001).

Os biossurfactantes e surfactantes são usados no tratamento de derrames de petróleo visando à redução da tensão superficial da água, iniciando/aumentando a concentração dos hidrocarbonetos na água, formando micelas (Christofi e Ivshina, 2002).

A formação de micelas aumenta a área de contato do petróleo com o meio, tornando fonte de carbono para os microrganismos. Os consórcios de microrganismos produzem enzimas que convertem o hidrocarboneto em intermediários do Ciclo de Krebs, podendo o mesmo ser convertido em energia, aminoácidos, proteínas e ácidos graxos (Crapez, 2001).

Recebendo, atualmente, grande atenção do mundo acadêmico, os biossurfactantes apresentam a mesma e/ou maior capacidade em dispersar o petróleo na água, terem uma grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (Nitschke e Pastore, 2002), biodegradabilidade, (Silva, 2004; Crapez *et al.*, 2002; Nitschke e Pastore, 2002; Ron e Rosenberg, 2002), além de mais seletivos e mais eficientes na biodisponibilização dos compostos hidrofóbicos, existindo ainda a possibilidade de serem produzidos *in situ* pelos microrganismos que utilizariam os contaminantes orgânicos como substrato para crescimento (Krespsky, 2004; Mulligan *et al.*, 2001; Ron e Rosenberg, 2002); além de menor toxicidade que o sintético, permitindo o seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (Nitschke e Pastore, 2002).

2. Material e métodos

2.1- Coleta do material biológico

O consórcio bacteriano foi isolado do biofilme da superfície da alga *Caulerpa racemosa* (Forsskål) Chlorophyta (Figura 4 e 5), coletada na praia do Forno, Búzios, Estado do Rio de Janeiro (22° 45'42,4"S e 41° 52'27,7"W) (Figura 1). Voltada para o sudoeste, à praia com 150 m de faixa de areia esta inserida ao fundo de uma estreita enseada, o Saco do Forno, com profundidade máxima de 12 m (Yoneshigue, 1985).



Figura 1: Localização da Enseada do Forno, Búzios, Estado do Rio de Janeiro.

2.2 - Extração do consórcio bacteriano dos substratos

As algas foram diluídas 1:5 em frascos de 50ml e submetidas ao tratamento de ultra-som por 5 minutos (Brason @3210), a fim de se proceder à desagregação do biofilme bacteriano (Silva *et al.*, 2003). As amostras das algas receberam choque térmico a 80°C e foram incubadas em meio contendo uréia, bactopectona e água do mar 75% a 37°C (Krespsky *et al.*, 2004).

2.3 - Bioamplificação e manutenção em meio de cultura líquido

A semeadura de manutenção do crescimento bacteriano foi em 10 ml de meio líquido, contendo água do mar 75%, esterilizada a 1 ATM por 20 minutos e bactopectona a 1% (Silva et al., 2003).

Nos experimentos da taxa de emulsificação ($TE_{24\%}$), emulsificação na fase aquosa (B) e não aquosa (A), tensão superficial (TS), carbono bacteriano (CB) foram usados meios contendo de 15 g/L de Bactopectona e 5 g/L de Uréia em 25% de água do mar. Nos testes de nutrição carbonatada, foi utilizado meio com 5 g/L de uréia.

2.4 – Emulsificação

Os testes foram realizados com as bactérias que obtiveram o maior crescimento em frascos de DBO. A seleção das bactérias foi feita através de observações da maior formação de partículas flutuantes (biofilme) nos frascos de DBO.

Adotou-se o uso de tubos de ensaios de 10 ml rosqueados, em triplicata, acrescidos de 4ml de amostras bacterianas e de 6ml de hidrocarbonetos gasolina (G), querosene (Q) e árabe-leve (AL), sendo separados em baterias distintas. Posteriormente o conteúdo foi homogeneizado com auxílio de um vortex durante 1 minuto e posto para encubar a temperatura ambiente durante 24 horas antes das leituras (Krepsky, 2004).

Com tempo de 0, 7, 15, 30 e 60 dias, da taxa de emulsificação ($TE_{24\%}$), foi determinada pela porcentagem da altura da camada de emulsão (mm), dividida pela altura total da coluna líquida (mm).

O parâmetro A foi definido como a emulsificação da substância hidrofóbica na fase não aquosa e o B, na fase aquosa. O A foi determinado pela porcentagem da altura da substância hidrofóbica emulsificada (mm) na fase não aquosa pela altura total desta fase (mm). O B foi determinado pela altura da substância hidrofóbica emulsificada (mm) na fase aquosa pela altura total desta fase (mm) (Paraszkiewicz et al., 2002) (Figura 2).

2.5 -Tensão superficial

Neste teste, o consórcio bacteriano dos tempos 7 e 15 dias, foram distribuídas, em duplicata, em frascos tipo Erlemmeyers de 250 ml de tampa esmerilhada encubados a temperatura ambiente. Para a análise, uma amostra de 80 ml foi retirada de cada frasco (Krepsky, 2004).

A TS foi verificada pelo método do anel, utilizando o tensiômetro K12 Krüss,. Em todo aferimento, água deionizada e o meio de cultura foram utilizados como controle.

2.6 -Carbono bacteriano:

Uma alíquota de 1ml do meio de maior crescimento foi separado e adicionado 1ml de formol a 4 % para paralisar as reações enzimáticas. Posteriormente envasados em um frasco âmbar e armazenados em geladeira, visando à conservação do material até a data da leitura.

Diluiu-se, em tubos de ensaio de vidro, 0,1 ml do material contido nos frascos âmbar em 1,85 ml de água deionizada estéril mais um marcador (com exceção do tempo 7, com 0,05 ml de amostra e 7,8 ml de água deionizada estéril (diluição de 81X). Como marcador para a visualização no microscópio de epifluorescência, utilizou-se laranja de acridina no volume de 75 µl (diluição final de 80X). O material é posteriormente filtrado em membrana de nucleopore de policarbonato preta, de 0,22µm de porosidade e 25mm de diâmetro. Uma bomba de vácuo foi utilizada para tornar os trabalhos mais rápidos.

A leitura é feita em microscópio de epifluorescência Axioskop, modelo 50 da Zeiss e com aumento de 1000 vezes. As células foram contadas em 10 campos, em triplicata, através de cálculos elaborados por Kepner et al. (1994). Para a quantificação do CB, foi utilizada uma fórmula de conversão de biovolume (Carlucci et al., 1986)

2.7- Nutrição carbonatada:

Diferente dos demais, estas análises bioquímicas sofreram tratamento diferenciado na composição do meio, como visto no item 2.3.

O meio foi distribuído em tubos de ensaio rosqueados 13:100, em triplicata, obedecendo a um volume de 5ml, sendo posteriormente autoclavados por 15 minutos a 1 atmosfera.

A caracterização nutricional utilizou substratos dependentes de transportadores de membrana. Ácido aspártico (ASP), lactose (L), ácido benzóico (AB), oxalato de amônio (O), citrato (C), glicose (GLI), galactose (G), histidina (HIS), árabe Leve (AL), foram acrescidas separadamente à água do mar diluída em água deionizada até sua completa dissolução. Algumas fontes de carbono devem ser aquecidas para melhor dissolução (Krepsky, 2004).

Foram inoculada 0,5 ml de amostras retiradas dos meios para isolamento e como os demais testes, respeitaram as leituras em 7, 15, 30, e 60 dias.

3- Resultados e discussão

O meio para a manutenção do consórcio bacteriano é uma mistura de nutrientes necessários ao crescimento bacteriano. A sua formulação deve levar em consideração o tipo fisiológico aos quais os microrganismos pertencem. A diluição final da água utilizada para o meio (25% de água do mar) visou a maior expressão de crescimento e evidenciar a ação dos surfactantes. A sobrevivência do consórcio demonstrou a capacidade de sobreviver em meio de baixa salinidade, por exibir uma grande taxa metabólica, aspecto baseado degradação dos hidrocarbonetos, o que foi observado nos experimentos.

Nos testes de $TE_{24\%}$ todos os compostos foram emulsificados. O AL foi o composto que apresentou a maior emulsificação, com 82,15% no T60 dias. Q e G apresentaram no mesmo período 53,9% e 45,62% (tabela1).

Tabela 1: Taxa de emulsificação de gasolina, querosene e árabe-leve, pelo consórcio bacteriano nos tempos 0, 7, 15, 30 e 60 dias.

Tempo	Substrato	TE ₂₄ %	A (%)	B (%)
Zero	Árabe- leve	67,15	60,74	90,20
	Gasolina	62,06	62,64	61,98
	Querosene	65,09	89,19	51,52
Sete	Árabe- leve	78,10	69,18	100,00
	Gasolina	50,19	100,00	7,58
	Querosene	57,38	68,40	44,69
Quinze	Árabe- leve	77,20	62,60	98,41
	Gasolina	40,63	30,16	48,89
	Querosene	3,41	0	6,90
Trinta	Árabe- leve	67,93	100,00	25,00
	Gasolina	38,03	8,73	56,70
	Querosene	61,96	54,17	70,00
Sessenta	Árabe- leve	82,15	95,40	63,33
	Gasolina	45,62	72,29	22,58
	Querosene	53,90	65,43	38,66

TE₂₄%: Taxa de emulsificação em 24 horas de repouso; A: emulsificação na fase não aquosa; B: emulsificação na fase aquosa.

O Querosene e a gasolina são os combustíveis de menor densidade utilizando nos testes (ITOPF, através de seu sítio, <http://www.itopf.com>). Era de se esperar que o consórcio bacteriano exibisse uma maior degradação para os mesmo; devido a exibir uma menor quantidade de carbonos e mais fácil assimilação. Pelos resultados de TE₂₄% este consórcio preferiu utilizar como fonte de carbono para as suas reações enzimáticas a substância mais densa.

O Querosene e a gasolina são hidrocarbonetos já trabalhados por uma indústria petroquímica. Antes de irem a venda, são acrescentados metais pesados, aditivos para aumentar a octanagem, o que maximiza o rendimento de um motor a explosão (Bitencourt, 2005) e álcool anidro (20% a 26%) (Cunha *et al.*, 2003). Estas substâncias quando presentes tendem a inibir a degradação desses compostos pelos microrganismos, pois afetam a integridade da membrana celular, além de desnaturar proteínas celulares (Pelczar *et al.*, 1996).

Dentre uma das mais importantes propriedades dos surfactantes e biosurfactantes é a de reduzir a tensão superficial entre líquidos. Biosurfactantes podem ser produzidos por microrganismos, plantas e animais, tais como o homem (Christofi e Ivshina, 2002). O surfactante produzido por este consórcio conseguiu reduzir a tensão superficial da água. No tempo 7, o controle foi reduzido de 55,97 mN/m para 51,97 mN/m (tabela 2).

Tabela 2: Diversidade nutricional de consórcios durante a incubação em variadas fontes de carbono.

Fonte de carbono	T7	T15	T30	T60
Ácido Aspártico	+++	+++	++-	+++
Lactose	+++	+++	+++	+++
Ácido Benzóico	+++	+++	+++	+++
Oxalato de Amônio	+++	+++	---	---
Citrato	+++	+++	+++	++-

Glicose	+++	+++	+++	++-
Galactose	+++	+++	+++	++-
Histidina	+++	+++	---	++-
Árabe - Leve	+++	+++	+++	+++

* +++ Crescimento ótimo; ++- Crescimento médio; --- Não houve crescimento.

O carbono bacteriano (CB) está relacionado à produção de biossurfactantes. Silva (2004) afirma que o CB é diretamente proporcional ao aumento da biomassa celular e taxas de emulsificação. Nestes experimentos, foi observada uma relação inversa entre CB (tabela 3) e TE24% (tabela 1) de AL (tabela 1) e G (tabela 1) ao longo de sessenta dias.

Tabela 3: Carbono bacteriano ao longo dos dias 0, 7, 15, 30 e 60.

Tempo (dias)	CB ($\mu\text{g.C.cm}^{-3}$)
0	8,993
7	5,313
15	6,991
30	5,187
60	2,309

A evidência que a emulsificação é um processo natural trazido por agentes extracelulares é indireta. Levando a pensar que a emulsificação é algo dependente da densidade celular. A concentração de células em um sistema aberto, como uma mancha de óleo em um corpo d'água, nunca alcançaria um alto valor efetivo de emulsificação (Ron e Rosenberg, 2002). Outro agravante é o fato de quando o óleo é emulsionado, ele tende a dispersar na água e não fica disponível somente aos responsáveis diretos da emulsificação e sim para toda a microbiota local (competidores).

Uma maneira de relacionar os dados e a teoria seria considerar que é natural a emulsificação de hidrocarbonetos, mas não a produção macroscópica de grandes volumes líquidos de compostos extracelulares. Se a emulsificação ocorre, ela ocorre próxima à superfície celular, sem envolver a criação de micro-ambientes (micro-habitat) independentes entre agrupamentos celulares diferentes; desmistificando o ideal de que é necessária a existência de uma alta densidade celular para existir uma emulsificação eficiente (Ron e Rosenberg, 2002).

Dados obtidos por Crapez (2001) e Silva (2004), afirmam estas teorias propostas por Ron e Rosenberg (2002).

A adição do testes de NC ao experimento visou à observação da diversidade metabólica do consórcio. Esta versatilidade se resume a capacidade de utilizar outras fontes de carbono, diferente da glicose. Compostos como polissacarídeos, ácidos nucléicos e lipídeos, não possuem transportadores específicos, necessitando a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares que as clivem, tornando-se fontes de carbono e doadores de elétrons (Ron e Rosenberg, 2002).

Substâncias como Ácido Aspártico, Lactose, Ácido Benzóico, Oxalato de amônio, Citrato, Glicose, Galactose, Histidina (tabela), que dependem de transportadores para entrada na célula para serem degradados, foram testados.

O Ácido Benzóico é muito utilizado na indústria alimentícia como conservante. Tem afinidade lipofílica e age dissipando o gradiente de pH da membrana podendo atuar no DNA e em enzimas. Em *Pseudomonas putida*, a entrada deste se dá por transporte ativo (Krepsky, 2004). Esta afinidade lipofílica causa danos à membrana celular.

Crapez *et al* (2000) e Krepsky (2004), estudando o impacto agudo e crônico causado por HPAs em comunidades bacterianas isoladas de dois pontos da Baía de Guanabara, mostraram que estas utilizavam o Ácido Benzóico quando submetidas a impacto agudo, aumentando consideravelmente a biomassa. Krepsky, em acordo, acredita que existe uma correlação na produção de enzimas que convertam o AL e Ácido Benzóico, a formas assimiláveis de carbono e doadores de elétrons.

Os resultados demonstraram a capacidade deste consórcio em utilizar petróleo como fonte de carbono, produção concomitante de substâncias com atividade surfactante e a grande diversidade metabólica. Garantindo a este consórcio ser uma ferramenta a biorremediação de regiões impactadas por petróleo..

4-Referências

- MARQUES JÚNIOR, A. N.; MORAES, R. B. C. e MOURAT, M. C. Poluição Marinha. In: *Biologia Marinha*. (Pereira, R. C. e Soares – Gomes, A. editores). Editora Interciência, Rio de Janeiro, p. 311-334, 2002.
- LIBES, S. M. The fate of pollutants in the coastal ocean. In: *An introduction to marine biogeochemistry* (Libes, S. M. Editor). Editora John Wiley & sons, Inc., p.597-647, 1992.
- CRAPEZ, M. A. C. Bactérias Marinhas. In: *Biologia Marinha* (Pereira, R. C. e Soares – Gomes, A. Editores) Editora Interciência, Rio de Janeiro, p. 81-101, 2002.
- CRAPEZ, M. A. C. Efeitos de Hidrocarbonetos de Petróleo Na Biota Marinha. In: *Efeitos dos Poluentes em Organismos Marinhos*. (Moraes, R.; Crapez, M. A. C.; Pfeiffer, W.; Farina, M.; Bainy, A.; e Teixeira, V. Editores). Editora Arte e Ciência – Vilipress, São Paulo, p. 255-270, 2001.

- CRAPEZ, M. A. C.; TOSTA, Z. T; BISPO, M. das G. S.; PEREIRA, D. C. Acute and Chronic Impacts Caused by Aromatic Hydrocarbons on Bacterial Communities at Boa Viagem and Forte do Rio Branco Beaches, Guanabara Bay, Brasil. *In: Environmental Pollution*. Editora Elsevier, v. 108, p. 291-295. 2000.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in fields studies of soil remediation. *In: Journal of Applied Microbiology*. Editora Elsevier, v. 93, p. 915-929, 2002;
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. Editora Química Nova, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *In: Current Opinion in Biotechnology*. Editora Elsevier, v. 13., p. 249-252, 2002.
- SILVA, F. Q. M. Produção de Biosurfactante Por Bactérias Isoladas de Sedimento de Mangue (APA de Guapimirim, RJ). Monografia. Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Marinha, UFF, p. 11-60. , 2004.
- BITENCOURT, J. A. P. Produção de Biossurfactante por Consórcio Bacteriano Isolado do Biofilme do Talo de Alga *Caulerpa racemosa* (Forsskål), Coletada na Praia do Forno, Búzios, Rio de Janeiro, Brasil.. Monografia. Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Marinha, UFF, p. 11-60 , 2005.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Heavy metals removal from sediments by biosurfactants. *In: Journal of Hazardous Materials*. Editora Elsevier, v. 85, p: 111-125, 2001.
- KRESPSKY, N. Produção de biossurfactantes por consórcios bacterianos hidrocarbonoclasticos. Tese de mestrado. Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Marinha, UFF, p. 2-119, 2004.
- YONESHIGUE, Y. Taxonomic et ecologie des algues marines dans region de Cabo Frio (Rio de Janeiro, Brésil). Tese de Doutorado. Universidade de Aix, Marseille, p. 466, 1985.
- Paraszkiewicz, K.; Kanwal, A.; Dlugonski, J. Emulsifier Production by Steroid Transforming Filamentous Fungus *Curvularia lunata*. Growth and Product Characterization. *Journal of Biotechnolgy*. Editora Elsevier v. 92, p. 287-294, 2002.
- Kepner, J.R.; Pratt, J. R. Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental Samples: Past and Present. *Microbiological Revision*, v. 58, p. 603-615, 1994.
- Carlucci, A. F.; Craven, D. B.; Robertson, D. J.; Williams, P. M. Surface-Film Microbial Populations Diel Amino Acid Metabolism, Carbon Utilization and Growth Rates. *Mar. Biol.*, v. 92 p. 289-297, 1986.
- INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION LIMITED. Sítio da internet: <http://www.itopf.com> , acessado em 30 de Novembro de 2004.
- PELCZAR, M.J.C; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. Microbiologia. Conceitos e aplicações. Editora Makroon Books do Brasil LTD., ed. 2, v. 1, Rio de Janeiro, p. 1-524, 1996.
- CUNHA, C.D; do ROSÁRIO, M.; ROSADO , A.S.; LEITE, S.G.F. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *In: Process Biochemistry*. Editora Elsevier, n.50, p: 2277- 2282, 2003.