

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

**Avaliação da capacidade deteriogênica de *Pseudallescheria boydii* e  
*Meyerozyma guilliermondii* durante estocagem simulada  
em diesel, biodiesel e mistura B10**

GABRIELA BOELTER

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

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Patrícia Dörr de Quadros

Porto Alegre  
Fevereiro/2017



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

**Avaliação da capacidade deteriorogênica de *Pseudallescheria boydii* e  
*Meyerozyma guilliermondii* durante estocagem simulada  
em diesel, biodiesel e mistura B10**

Gabriela Boelter

Bacharel em Ciências Biológicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Biodeterioração de combustíveis e biocombustíveis

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

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Patrícia Dörr de Quadros

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Fevereiro/2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Boelter, Gabriela

Avaliação da capacidade deteriogênica de  
*Pseudallescheria boydii* e *Meyerozyma guilliermondii*  
durante estocagem simulada em diesel, biodiesel e  
mistura B10 / Gabriela Boelter. -- 2017.  
136 f.

Orientadora: Fátima Menezes Bento.

Coorientadora: Patrícia Dörr de Quadros.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Degradação fúngica. 2. Biocombustível. 3.  
Lipase. 4. GC-MS. 5. RMN. I. Bento, Fátima Menezes ,  
orient. II. de Quadros, Patrícia Dörr, coorient. III.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“A sorte favorece as mentes preparadas”

Louis Pasteur

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, João e Tânia, pela compreensão ao longo deste período importante em minha carreira, mostrando a importância da busca pelo conhecimento e por me incentivarem a ir atrás dos meus objetivos. Ao meu irmão, Rafael, que mesmo longe, se preocupou e me apoiou ao longo destes 2 anos.

Agradeço minha querida orientadora, Professora Fátima Menezes Bento, pela oportunidade em fazer parte de sua equipe, pelos valiosos conselhos e pela sabedoria compartilhada.

Às minhas colegas e amigas do LAB-BIO, Patrícia, Sabrina, Juciana e Aline que me ensinaram o possível sobre biodegradação de combustíveis, sempre dispostas a ajudar. Agradeço pela parceria, companhia e pelas boas risadas dentro e fora do laboratório.

Agradeço ao meu namorado, Lucas, por me ouvir, me apoiar e estar ao meu lado em cada conquista alcançada.

A todos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente que fizeram parte de minha formação e que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

Aos professores e às alunas do Departamento de Química da UFRGS pelas análises desenvolvidas.

Aos colegas da pós-graduação pela companhia nas disciplinas e na rotina de laboratório, tirando dúvidas e trocando experiências em meio de momentos de descontração.

Aos amigos mais antigos que me acompanham desde a escola e graduação, sempre presentes nos momentos bons e ruins.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

**Avaliação da capacidade deteriogênica de *Pseudallescheria boydii* e *Meyerozyma guilliermondii* durante estocagem simulada em diesel, biodiesel e mistura B10**

Autor: Gabriela Boelter

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

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Patrícia Dörr de Quadros

**RESUMO**

Conforme a previsão do governo brasileiro, até 2019, o óleo diesel (B0) receberá o aumento de 10% de biodiesel, compondo a mistura B10. O biodiesel, devido a sua natureza renovável e sustentável, impulsiona estudos prevendo a estabilidade durante o armazenamento. Neste sentido, o biodiesel utilizado no Brasil é composto por metil ésteres de cadeias longas de ácidos graxos derivados da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais. Além da possibilidade de degradação química, a natureza das moléculas também o tornam mais suscetível à biodegradação. O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade deteriogênica (crescimento, degradação e detecção de genes) relacionado com a degradação de combustíveis pelo fungo filamentoso *Pseudallescheria boydii* e pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* em diesel puro (B0); biodiesel puro (B100) e na mistura B10, em meio mineral durante estocagem simulada. Foram incubados por 45 dias a 30°C frascos contendo proporções (1:6, 2:3 e 2:1) de combustível (B0, B10 e B100) em relação ao meio mínimo mineral BH com inóculo de  $10^4$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  de *Pseudallescheria boydii*. Para a avaliação de *Meyerozyma guilliermondii*,  $10^2$  células  $\text{mL}^{-1}$  foram acrescentadas a 5 mL de B10 ou B100 e 30 mL de meio mínimo mineral BH, incubados em agitação (120 rpm) a 28°C por 10 dias. Para o acompanhamento da formação de biomassa foi realizado o método gravimétrico. A curva de crescimento da levedura foi estimada pela contagem de UFC  $\text{mL}^{-1}$ . A fase aquosa foi analisada pelas metodologias de produção de lipase, medidas de pH e de tensão superficial, IE<sub>24</sub> e GC-MS com SPME. A detecção de genes funcionais foi realizada por PCR. A degradação de ésteres e hidrocarbonetos foi avaliada por IV e RMN. Em relação ao fungo filamentoso, as medidas de biomassa produzida ao longo dos 45 dias indicaram maior produção de biomassa no combustível B10. Quanto à levedura, não se obteve diferença significativa na curva de crescimento entre B10 e B100. Em ambos os fungos não houve produção significativa de biossurfactante, mas foi detectada produção de lipase e os genes P450 e de lipase foram amplificados. A emulsificação da fase oleosa foi observada apenas no experimento com a levedura. Os compostos identificados na fase aquosa por cromatografia com os dois fungos foram: álcoois, ésteres, ácidos, sulfurados, cetonas e fenóis. Ambos microrganismos cresceram às expensas de diesel e biodiesel e meio mínimo mineral. *Pseudallescheria boydii* degradou os hidrocarbonetos e ésteres do combustível e biocombustível, respectivamente.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (136 p.) fevereiro, 2017.

# **Evaluation of deteriogenic potential of *Pseudallescheria boydii* and *Meyerozyma guilliermondii* during simulated storage of fuels (diesel, biodiesel and B10 blend)**

Author: Gabriela Boelter

Advisor: Prof. Dr. Fátima Menezes Bento

Co-Advisor: Dr. Patrícia Dörr de Quadros

## **ABSTRACT**

According to the Brazilian government's forecast, until 2019, diesel oil (B0) will receive a 10% increase in biodiesel, composing the B10 blend. Biodiesel due to its renewable and sustainable nature boosts studies predicting stability during storage. In this sense, the biodiesel used in Brazil is composed of methyl esters of long chains of fatty acids derived from transesterification of vegetable oils or animal fats. In addition to the possibility of chemical degradation, the nature of the molecules also make it more susceptible to biodegradation. The aim of this work was to evaluate the deteriogenic potential (growth, degradation and detection of genes) related to the degradation of fuels such as pure diesel (B0), pure biodiesel (B100) and the B10 blend of *Pseudallescheria boydii* and *Meyerozyma guilliermondii* in mineral medium during storage. Different ratios (1: 6, 2: 3 and 2: 1) of fuel (B0, B10 and B100) with respect to the minimal mineral medium BH were incubated for 45 days at 30°C with inoculum of  $10^4$  spores  $\text{mL}^{-1}$ . For the evaluation of *Meyerozyma guilliermondii*,  $10^2$  cells  $\text{mL}^{-1}$  were added to 5 mL of B10 or B100 and 30 mL of minimal BH mineral medium, incubated with shaking (120 rpm) at 28°C for 10 days. We estimate the yeast growth curve by the count of CFU  $\text{mL}^{-1}$ . We analyzed the aqueous phase by any methodologies as lipase production, pH and surface tension measurements, IE24 and GC-MS with SPME. The detection of functional genes for hydrocarbon degradation was performed by PCR. The degradation of esters and hydrocarbons was evaluated by IR and NMR. In relation to the filamentous fungus, the biomass measurements produced during the 45 days indicated higher biomass production in the B10 fuel. As for yeast, there was no significant difference in the growth curve between B10 and B100. In both fungi, there was no significant production of biosurfactant, but production of lipase and the P450 and lipase gene was detected. Oily emulsification was observed only in the yeast experiment. We identified degradation products by the chromatography in the aqueous phase. The compounds identified were alcohols, esters, acids, sulfur, ketones and phenols. Both microorganisms grew at the expense of diesel, biodiesel and minimal mineral medium. *Meyerozyma guilliermondii* e *Pseudallescheria boydii* degraded hydrocarbons and esters of fuel and biofuels, respectively.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.(136 p.) february, 2017.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos	3
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	4
3.1	Cenário dos biocombustíveis no Brasil	4
3.2	Diesel	6
3.3	Biodiesel	6
3.4	Degradação abiótica	8
3.5	Degradação biótica	9
3.5.1	Enzimas Oxigenase	12
3.5.2	Enzimas Lipase e Esterase	14
3.5.3	Biosurfactantes e bioemulsificantes	15
3.5.4	Suscetibilidade do biodiesel à biodegradação	17
3.6	Estudos dos fungos deteriorogênicos <i>Pseudallescheria boydii</i> e <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	18
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO 1</b>	20
	RESUMO	21
4.1	INTRODUÇÃO	22
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.2.1	Combustíveis	24
4.2.2	Esterilização	24
4.2.3	Meio Mínimo Mineral	24
4.2.4	Microrganismo	24
4.2.5	Inóculo	25
4.2.6	Condições de estocagem simulada com diesel, biodiesel e mistura B10 em diferentes proporções de fase oleosa e aquosa	25
4.2.7	Coletas de fase oleosa, fase aquosa e biomassa	26
4.2.8	Quantificação da biomassa	27
4.2.9	Análises de fase aquosa	27
4.2.9.1	Detecção da produção de lipase	27
4.2.9.2	Medidas de pH	27
4.2.9.3	Microextração em fase sólida e Cromatografia gasosa	28
4.2.9.4	Medida de condutividade	28
4.2.9.5	Tensão superficial	28
4.2.9.6	Índice de emulsificação (IE24)	29
4.2.10	Análises da fase oleosa	29
4.2.10.1	Espectroscopia de infravermelho	29
4.2.10.2	Ressonância Magnética Nuclear	29
4.2.11	Detecção de genes de degradação	30
4.2.11.1	Extração de DNA	30
4.2.11.2	Detecção de genes de Citocromo P450 e lipase	30
4.2.12	Análises estatísticas	31
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS</b>	32
<b>4.4</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	59
<b>4.5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	68

<b>5.</b>	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	69
	<b>RESUMO</b> .....	70
<b>5.1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	71
<b>5.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	73
5.2.1	Combustíveis .....	73
5.2.2	Esterilização.....	73
5.2.3	Meio Mínimo Mineral.....	73
5.2.4	Microorganismo .....	73
5.2.5	Inóculo .....	74
5.2.6	Condições de estocagem simulada com biodiesel e mistura B10 .....	74
5.2.7	Coletas de fase oleosa, fase aquosa e biomassa .....	75
5.2.8	Análises da fase aquosa .....	75
5.2.8.1	Curva de crescimento .....	75
5.2.8.2	Quantificação da biomassa .....	75
5.2.8.3	Detecção da produção de lipase .....	76
5.2.8.4	Medidas de pH.....	76
5.2.8.5	Microextração em fase sólida e Cromatografia gasosa .....	76
5.2.8.6	Tensão superficial .....	77
5.2.8.7	Índice de emulsificação (IE <sub>24</sub> ) .....	77
5.2.8.8	Avaliação da Hidrofobicidade Celular .....	78
5.2.9	Análises da fase oleosa .....	78
5.2.9.1	Espectroscopia de infravermelho .....	78
5.2.10	Detecção de genes de degradação .....	79
5.2.10.1	Extração de DNA .....	79
5.2.10.2	Detecção de genes de Citocromo P450 e lipase .....	79
5.2.11	Análise estatísticas .....	80
<b>5.3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	81
<b>5.4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	95
<b>5.5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	99
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	100
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	102
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	103
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	117

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Enzimas relacionadas à degradação de alcanos. Fonte: Jan B. van Beilen, 2007.....	13
Tabela 2. Rampa de temperatura de GC-MS. ....	28
Tabela 3. Valores da biomassa (mg) do fungo <i>Pseudallescheria boydii</i> em proporções de fase oleosa e aquosa de 1:6, 2:3 e 2:1 em diesel B0, blenda B10 e biodiesel B100 e meio mínimo BH por 45 dias.....	33
Tabela 4. Compostos presentes na fase aquosa em contato com B10 aos 20 e 30 dias nas proporções 1:6, 2:3 e 2:1 e seus respectivos controles.....	37
Tabela 5. Compostos presentes na fase aquosa em contato com B100 aos 30 dias nas proporções 1:6, 2:3 e 2:1 e seus respectivos controles .....	38
Tabela 6. Valores das medidas de condutividade ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) dos tempos 0, 10, 20, 30 e 45 dias de incubação com combustíveis B0, B10 e B100 nas proporções de fase oleosa e aquosa de 1:6, 2:1 e 2:3. Valores iniciais do meio mínimo mineral: $3,86 \text{ mS cm}^{-1}$ .....	40
Tabela 7. Valores das medidas de tensão superficial ( $\text{mN m}^{-1}$ ) dos tempos 0, 10, 20, 30 e 45 dias de incubação com combustíveis <b>B0, B10 e B100</b> nas proporções de fase oleosa e aquosa de 1:6, 2:1 e 2:3. Valores iniciais do meio mínimo mineral: $68,47 \text{ mN m}^{-1}$ .....	42
Tabela 8. Detecção de produção de lipase em ágar tributirina.....	44
Tabela 9. Valores de absorbância máxima do pico da carbonila e a percentagem de degradação do combustível B10.. ....	49
Tabela 10. Valores de absorbância máxima do pico da carbonila e a percentagem de degradação do combustível B100.....	49
Tabela 11. Valores de integração dos sinais de RMN e a percentagem de degradação do combustível B10 nos tempos 0, 20 (proporção 1:6) e 45 dias (proporção 2:1).....	55
Tabela 12. Valores de integração dos sinais de RMN e a percentagem de degradação do combustível B100 nos tempos 0, 20 (proporção 1:6) e 45 (proporção 1:6) dias. ....	55
Tabela 13. Rampa de temperatura de GC-MS.....	77
Tabela 14. Valores de peso seco ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) .....	82
Tabela 15. Detecção da produção de lipase por <i>Meyerozyma guilliermondii</i> em meio mínimo mineral BH contendo B10 e B100... ..	83
Tabela 16. Compostos presentes na fase aquosa em contato com B10 do tempo 240 horas e seus respectivos controles.....	85
Tabela 17. Compostos presentes na fase aquosa em contato com B100 do tempo 240 horas e seus respectivos controles. ....	86
Tabela 18. Valores das medidas de tensão superficial ( $\text{mN m}^{-1}$ ) da fase aquosa dos tempos 0, 72 e 240 horas de incubação com combustíveis B10 e B100.....	87
Tabela 19. Percentagem de hidrofobicidade celular em B10 e B100.....	88
Tabela 20. Valores do Índice de emulsificação (%) da fase aquosa dos tempos 72 e 240 horas com combustíveis B10 e B100.....	88

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Produção de biodiesel distribuída por regiões brasileiras. Fonte: ANP, 2016.....	5
Figura 2. Reação de transesterificação. Fonte: Knothe et al., 2006.....	7
Figura 3. Representação das formas em que a água pode ser encontrada nos tanques de combustível. Fonte: Bento <i>et al.</i> , 2016.....	10
Figura 4. Aspecto de biomassa de fungo filamentosos. (a) Contato com B10 e meio mineral por 60 dias (b) Contato com B10 e meio mineral por 90 dias (c) Contato com caldo malte por 30 dias. Fonte: Gabriela Boelter, 2016.....	11
Figura 5. Reação dependente de citocromo P450. Fonte: Adaptado de Cresnar, 2011.....	13
Figura 6. Reação catalisada por carboxilesterase. Fonte: BRENDA-Enzymes,2016.....	15
Figura 7. Aspecto do microcosmo contendo combustíveis B0, B10 e B100 nas proporções 1:6, 2:3 e 2:1 de fase aquosa e oleosa e meio mínimo mineral BH. Fonte: Gabriela Boelter, 2015.....	26
Figura 8. Aspecto dos microcosmos com combustível e meio BH nas proporções 1:6, 2:3 e 2:1 com inóculo aos 10 e 45 dias de incubação.....	34
Figura 9. Medidas de pH ao longo de 45 dias do meio BH com inóculo e combustíveis B0, B10 e B100 em proporções de fase oleosa e aquosa de 1:6, 2:3 e 2:1.....	35
Figura 10. Medidas de pH ao longo de 45 dias dos controles do meio BH e combustíveis B0, B10 e B100 em proporções de fase oleosa e aquosa de 1:6, 2:3 e 2:1.....	36
Figura 11. Escores e pesos da análise por componentes principais dos valores de pH, peso seco, tensão superficial e amostras de B0, B10 e B100 nas proporções 1:6, 2:3 e 2:1 aos 45 dias. Azul: variáveis suplementares. Vermelho: variáveis ativas.....	45
Figura 12. Espectro da região de infravermelho de B10 aos 20 e 45 dias. Tempo 0 - azul; Controle - preto; 1:6 - vermelho; 2:1 - verde; 2:3 - ciano.....	47
Figura 13. Espectro da região de infravermelho de B100 aos 20 e 45 dias. Tempo 0 - azul; Controle - preto; 1:6 - vermelho; 2:1 - verde; 2:3 - ciano.....	48
Figura 14. Dendrograma de análises de B10 Tempo 45: proporção 1:6 - rosa; proporção 2:3 - amarelo; proporção 2:1 - ciano. Tempo 20: proporção 1:6 - verde; proporção 2:3, controles proporção 1:6 e 2:3 - azul. Tempo 20 e 45: controles proporção 1:6, 2:3 e 2:1. Tempo zero - vermelho.....	50
Figura 15. Dendrograma de análises de B100 Dendrograma de análises de B100. Proporção 1:6 (tempo 20 e 45) - verde; proporção 2:1, controles proporção 1:6, 2:3 e 2:1 - azul; tempo zero, proporção 2:3 e 2:1 (tempo 20 e 45), controles proporção 2:1 e 2:3 (tempo 20) - vermelho.....	51
Figura 16. Escores de PCA das análises de B10.....	52
Figura 17. Gráfico de pesos para a primeira componente principal obtido pela PCA dos dados espectrais das amostras de B10.....	52

Figura 18. Escores de PCA das análises de B100.....	53
Figura 19. Gráfico de pesos para a primeira componente principal obtido pela PCA dos dados espectrais das amostras de B100.....	53
Figura 20. Espectro de RMN-H <sup>1</sup> dos combustíveis no tempo inicial de B0, B10 e B100.....	54
Figura 21. Espectro de RMN-C <sup>13</sup> de B100 nos tempos 0 e 45 dias.....	56
Figura 22. Detecção do gene P450 (292 pb) em <i>P. boydii</i> após crescimento em caldo malte. MM: Marcador molecular (100 pb); C+: controle positivo; P. b: <i>P. boydii</i> ; C-: Controle negativo.....	57
Figura 23. Detecção do gene de carboxilesterase (590 pb) em <i>P. boydii</i> após crescimento em caldo malte. MM: Marcador molecular (100 pb); C+: controle positivo; P. b: <i>P. boydii</i> ; C-: Controle negativo.....	58
Figura 24. Microcosmo contendo 20% de B10 e B100 em meio mínimo mineral BH. Fonte: Gabriela Boelter, 2016.....	75
Figura 25. Curva de crescimento (UFC mL <sup>-1</sup> ) de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> em meio mínimo mineral BH e B10 e B100.....	81
Figura 26. Aspecto dos microcosmos contendo B10 e B100 nas condições com inóculo e controle após 240 horas.....	82
Figura 27. Imagens da coloração de Gram de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (Aumento de 100x). (a) ágar GYMP após 48 horas; (b) B10 e meio BH após 240 horas; (c) B100 e meio BH após 240 horas. Fonte: Gabriela Boelter, 2016.....	82
Figura 28. Medidas de pH do meio mínimo mineral BH com B10 ao longo de 240 horas do tratamento e controle.....	84
Figura 29. Medidas de pH do meio mínimo mineral BH com B100 ao longo de 240 horas do tratamento e controle.....	84
Figura 30. Aspecto da emulsão formada após 24 horas (IE <sub>24</sub> ) com amostra proveniente do meio mineral com B10 e B100 após 72 e 240 horas de incubação com e sem <i>M. guilliermondii</i> .....	88
Figura 31. Escores e pesos da análise por componentes principais de pH, peso seco, tensão superficial e amostras B10 e B100 em 0 e 240 horas. Azul: variáveis suplementares. Vermelho: variáveis ativas.....	89
Figura 32. Espectro de infravermelho de combustível B10 das amostras de tratamento, controle e tempo inicial.....	90
Figura 33. Espectro de infravermelho de combustível B100 das amostras de tratamento, controle e tempo inicial.....	91
Figura 34. Escores de PCA das análises de B10 das amostras de tratamento e controle.....	92
Figura 35. Escores de PCA das análises de B100 das amostras de tratamento e tempo inicial.....	93
Figura 36. Detecção do gene P450 (401 pb) de <i>M. guilliermondii</i> após crescimento em caldo GYMP. MM: Marcador molecular (100 pb); M.g: <i>M. guilliermondii</i> ; C+: controle positivo; C-: controle negativo.....	94
Figura 37. Detecção do gene de triacilglicerol lipase (100 pb) de <i>M. guilliermondii</i> após crescimento em caldo GYMP. MM: Marcador molecular (100 pb); M.g: <i>M. guilliermondii</i> ; C+: controle positivo; C-: controle negativo.....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo
FT-IR/ATR	Infravermelho com transformada de Fourier empregando reflexão total atenuada
GC-MS	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
HCA	Análise por Agrupamentos Hierárquicos
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HS-SPME	Microextração por fase sólida-headspace
IE <sub>24</sub>	Índice de Emulsificação
INT	Instituto Nacional de Tecnologia
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
IV	Infravermelho
LBT	Luria-Bertani Tributyrin
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mN m <sup>-1</sup>	miliNewton por metro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Densidade óptica
pb	Pares de base
PCA	Análise por Componentes Principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDMS	Polidimetilsiloxano
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RBTB	Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPME	Microextração em Fase Sólida
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta

## 1. INTRODUÇÃO

Combustíveis derivados do petróleo, como o diesel e a gasolina, têm sido a principal fonte energética mundial, porém, a procura por alternativas mais sustentáveis e não impactantes ao ambiente tem incentivado pesquisas no uso de biodiesel. De acordo com a ANP, atualmente existem dois tipos de óleo diesel comercializados no Brasil, o óleo diesel marítimo e o rodoviário. O óleo diesel é classificado como tipo A (sem adição de biodiesel) ou tipo B (com adição de biodiesel). Atualmente, essa proporção é de 7% de biodiesel adicionado ao diesel (B7) e a perspectiva é que esse percentual continue aumentando no país (ANP, 2016). O biodiesel puro utilizado no Brasil é composto por metil ésteres de cadeias longas de ácidos graxos derivados da transesterificação de óleos vegetais (de soja, algodão, macaúba, entres outros) ou gorduras animais (bovina, suína, de frango) para ser utilizado nos motores de ignição e compressão.

Os primeiros estudos envolvendo a biodeterioração de combustíveis no Brasil foram realizados por Gutheil (1966) com o isolamento de *Cladosporium resinae* de tanques de querosene. Segundo Passman (2013), a diversidade microbiana dos sistemas de combustíveis inclui bactérias, fungos e arqueas. Para que a deterioração dos combustíveis por microrganismos ocorra, são necessárias algumas condições. A presença de uma comunidade microbiana com a capacidade de utilizar (tornar disponível e degradar) esse combustível como fonte de carbono é essencial, sendo que estas competências são traduzidas pela produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas e substâncias biossurfactantes. Biossurfactantes são um grupo de metabólitos geralmente secundários com propriedades de reduzir a tensão superficial e interfacial e são sintetizados por uma ampla variedade de microrganismos.

Há diversos grupos de enzimas produzidas por microrganismos deteriogênicos que atuam na degradação tanto de compostos do diesel quanto do biodiesel. As oxigenases estão envolvidas no processo de ativação e incorporação de oxigênio ao substrato. A biodegradação do biodiesel também pode ocorrer com o envolvimento das enzimas que atuam primeiramente no catabolismo dos ésteres realizando a hidrólise do metil ou etil éster. Esta reação é catalisada por uma esterase (ou lipase) que resulta em um ácido graxo e um álcool. Após esta reação,

os ácidos graxos são incorporados às células microbianas por processos de  $\beta$ -oxidação (Pepper *et al.*, 2011).

A biodegradação de combustíveis por microrganismos durante a estocagem está associada ao comprometimento da qualidade final do produto, dos equipamentos e peças do sistema de combustível, e ao entupimento de filtros (prensa e motor) devido principalmente à biomassa (lodo biológico) que se forma na interface óleo-água. Durante o transporte e o armazenamento pode ocorrer o acúmulo de água na parte inferior dos caminhões e tanques, respectivamente. A infiltração da água pode ocorrer por problemas de vedação, ou mesmo pela condensação da umidade nas paredes internas dos caminhões e tanques. O contato direto entre a água livre (que pode ainda encontrar-se dissolvida no combustível) favorece o crescimento microbiano e o desenvolvimento de biofilmes na interface óleo-água ou aderido às paredes do tanque (Bento *et al.*, 2010; Passman, 2013; ASTM 2014).

A natureza microbiana do lodo biológico tem mostrando a importância da participação dos fungos filamentosos deteriorogênicos (Ulfig *et al.*, 2006; Bucker *et al.*, 2011). Desta forma, investigações devem ser conduzidas sobre a cinética de crescimento, genes relacionados à degradação e deterioração dos combustíveis e biocombustíveis, especialmente durante armazenamento simulado. Fungos e leveduras apresentam melhor desempenho em degradar óleos sob condições que não favorecem o crescimento de bactérias. Fungos filamentosos são vantajosos quanto a este aspecto pela presença de hifas e que aumenta a área de superfície permitindo a penetração de hidrocarbonetos e agregados carregados de hidrocarbonetos anóxicos. Leveduras acumulam ácidos graxos em vacúolos e fungos filamentosos agregam intracelularmente alcanos não-assimilados em casos de excesso de carbono. Poros e canais presentes na superfície celular auxiliam na penetração de hidrocarbonetos que se movimentam em direção à membrana plasmática. O uso de ferramentas que avaliam o impacto do crescimento microbiano sobre o combustível, como a degradação de ésteres e hidrocarbonetos e a produção de metabólitos pelos microrganismos, pode auxiliar na adoção de medidas para mitigar os problemas derivados da contaminação microbiana.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade deteriorogênica (crescimento, degradação e detecção de genes relacionados com a degradação dos combustíveis) dos fungos *Pseudallescheria boydii* e *Meyerozyma guilliermondii* em meio mineral e diesel puro (B0); biodiesel puro (B100) e a mistura B10 durante estocagem simulada.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Avaliar o crescimento de *Pseudallescheria boydii* e *Meyerozyma guilliermondii* em meio mineral e diesel puro (B0); biodiesel puro (B100) e a mistura B10 com diferentes proporções de fase oleosa durante a degradação das frações de hidrocarbonetos e de ésteres, pelos microrganismos durante a estocagem simulada (microcosmos).
- 2.2.2 Avaliar a degradação das frações de hidrocarbonetos de diesel e ésteres de biodiesel utilizados no crescimento de *Pseudallescheria boydii* e *Meyerozyma guilliermondii*.
- 2.2.3 Avaliar a produção de biossurfactantes durante o crescimento de *Pseudallescheria boydii* e *Meyerozyma guilliermondii*.
- 2.2.4 Detectar a presença de genes funcionais (Citocromo P450 e lipase) em *Pseudallescheria boydii* e *Meyerozyma guilliermondii* relacionados a degradação de hidrocarbonetos e ésteres por PCR convencional.
- 2.2.5 Analisar os metabólitos presentes na fase aquosa do crescimento dos fungos por cromatografia e por extração em fase sólida.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Cenário dos biocombustíveis no Brasil

Relatos de aumento de poluição na atmosfera e possível esgotamento de fontes não renováveis tem incentivado estudos e utilização de combustíveis de fontes sustentáveis. Portanto, a comunidade científica investe na produção dos biocombustíveis derivados de plantas oleaginosas, gordura animal, óleo residual, microrganismos e microalgas (Bergmann *et al.*, 2013; Laviola, 2014; D'Agosto *et al.*, 2015; de Souza *et al.*, 2016). O diesel e biodiesel fazem parte da matriz energética do Brasil sendo usados no segmento ferroviário, rodoviário e marítimo.

A produção de biodiesel proveniente de plantas oleaginosas é expressiva devido às condições favoráveis de solo, clima, água e biodiversidade no Brasil. O óleo de soja é a principal matéria-prima (77,7% do total), seguido por gordura animal (18,8%), óleo de algodão (2%) e outros materiais graxos (1,5%). Em comparação a 2014, em 2015, a produção total de biodiesel no Brasil foi 15,1% maior (ANP, 2016). Avaliando a produção nas diferentes regiões brasileiras, a Região Centro-Oeste é a maior produtora de biodiesel, com volume de cerca de 1,7 milhão de m<sup>3</sup>, equivalente a 44,4% da produção nacional.

A Região Sul, tem a segunda maior produção, com 1,5 milhão de m<sup>3</sup>, 38,4% do total nacional (Figura 1). Por estados, o Rio Grande do Sul é o maior produtor de biodiesel, com um volume de 1,1 milhão de m<sup>3</sup>, equivalente a 28,3% do total nacional, após uma alta de 14,7% da sua produção. As principais matérias primas utilizadas no estado são soja e sebo bovino.

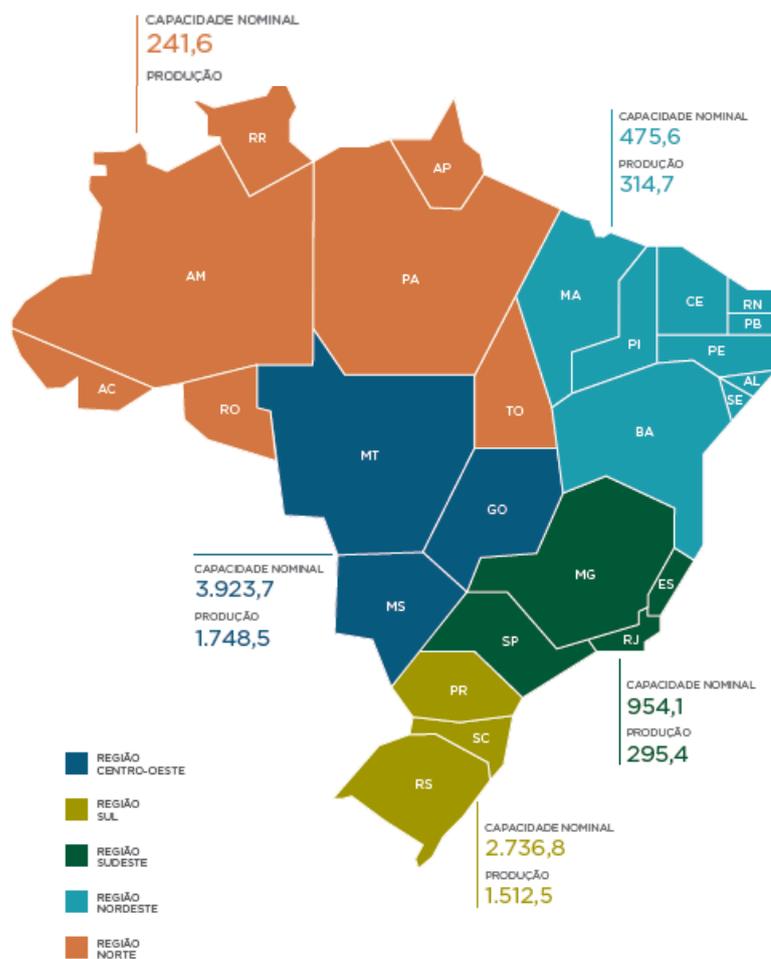


Figura 1. Produção de biodiesel distribuída por regiões brasileiras. Fonte: ANP, 2016.

Em 2005, um marco no desenvolvimento do biodiesel foi a criação do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) que viabilizou a produção e uso do biodiesel no país, a diversificação das matérias-primas e a introdução da agricultura familiar no processo. Como o programa não cumpriu suas metas, foi estabelecida pelo Governo a Lei nº 11.097/2005 em que a adição de 2% de biodiesel ao diesel seria obrigatória, formando a mistura B2. O acréscimo do biodiesel foi crescente nos anos seguintes. A partir de novembro de 2014, conforme a Lei nº 13.033/2014, o percentual de biodiesel estabelecido foi de 7% e segundo previsões do governo brasileiro, o óleo diesel receberá o aumento de 10% de biodiesel, constituindo o B10 em 2019. O biodiesel puro, denomina-se B100 e diesel puro, B0. A mistura ou blenda entre diesel e biodiesel é designada “Bx”, dependendo do percentual de adição de biodiesel ao diesel. Em 2015, foi publicada a Resolução CNPE nº3/2015 em que se autorizou a comercialização e o uso voluntário de misturas

com biodiesel, em quantidade superior ao percentual de sua adição obrigatória ao óleo diesel.

Existem mudanças aplicadas ao diesel com o intuito de diminuir os impactos negativos ao ambiente. Em relação aos teores de enxofre, atualmente no Brasil existem dois tipos de óleo diesel sendo comercializados: o diesel com até 500 ppm de enxofre (S500) e com ultra baixo teor de enxofre (ULSD) com até 10 ppm (S10) (Resolução ANP 50 /2013). O diesel S50 (50 ppm de enxofre) foi substituído por S10 (10 ppm de enxofre) pela Resolução ANP nº 65/2011. O óleo diesel A S-1800 e B S-1800 deixaram de ser comercializados em uso rodoviário em 1º de janeiro de 2014.

### 3.2 Diesel

O óleo diesel é um derivado da destilação fracionada do petróleo. É uma mistura de hidrocarbonetos constituída entre 8 a 32 átomos de carbono, em que 40% são de n-alcenos, 39% de iso e cicloalcenos, 25% de hidrocarbonetos aromáticos e ainda de policíclicos aromáticos (HPA) e frações de isopropenóides acíclicos (Bento *et al.*, 2016). Com sua combustão, ocorre a emissão de óxidos de enxofre e nitrogênio, metais tóxicos, compostos orgânicos voláteis, dióxido de carbono e outros compostos como formaldeído e acroleína que podem causar sérios problemas à saúde humana e ao ambiente (Betha *et al.*, 2013; Claxton, 2015).

O primeiro conceito de motor à diesel foi dado por Rudolph Diesel na década de 1890, provando que o combustível pode ser inflamado com pressão em vez de uma faísca. Desde que Rudolph Diesel inventou seu primeiro motor a diesel, tem sido utilizado em todo o mundo em agricultura, automóveis, equipamentos de construção, eletricidade, geradores, navios, trens e muitas outras aplicações (Betha *et al.*, 2013). No Brasil, atualmente são comercializados o diesel marítimo e rodoviário, classificados como diesel A (sem adição de biodiesel) e B (com adição de biodiesel) (ANP, 2016).

### 3.3 Biodiesel

Pelos ideais de sustentabilidade divulgados mundialmente, há diversos incentivos na área de biocombustíveis que são provenientes de materiais renováveis, ajudando a minimizar a queima de combustíveis fósseis e a liberação de poluentes.

Dentre os biocombustíveis está o biodiesel, obtido pela reação de transesterificação que ocorre entre um triacilglicerídeo e um álcool como etanol e metanol, formando um etil ou metil-éster como produto e glicerina como co-produto (Figura 2). Outra rota pode ser utilizada, a de craqueamento e hidrocraqueamento de materiais graxos (Dupont *et al.*, 2009). Desta forma, o produto resultante é física e quimicamente similar ao diesel, podendo ser utilizado puro ou em blendas. Catalisadores podem ser usados no processo, como ácidos ou bases. Em termos de composição, o biodiesel de soja abrange C16:0 (Palmítico), C18:0 (Esteárico), C18:1 (Oléico), C18:2 (Linoleico) e C18:3 (Linolênico), predominando ésteres de ácidos graxos insaturados, como o ácido linoléico com um teor de, aproximadamente, >50% (Ferrari *et al.*, 2005; Pullen & Saeed, 2014).

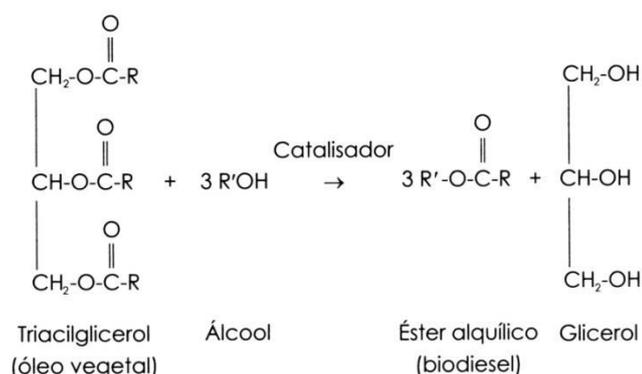


Figura 2. Reação de transesterificação. Fonte: Knothe *et al.*, 2006

Os primeiros relatos de uso de biodiesel datam da década de 1980 (Salvi & Panwar, 2012). No Brasil, o primeiro relato data de meados da década de 70, sendo proposto o Prodiel, óleo composto por óleos vegetais modificados pela reação de transesterificação e com poder calorífico semelhante ao do óleo diesel mineral (Parente, 1993). Este óleo diesel vegetal anos depois viria a ser denominado “biodiesel”. A retomada dos biocombustíveis, migrando para o biodiesel, foi na década de 1990. No final de 2002, com o lançamento do ProBiodiesel, foi viabilizada a substituição gradual e parcial do óleo diesel pelo biodiesel. Em 2005, foi publicada a Lei N°11.097 que estabelecia condições legais para a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Em 2006, foi criada a Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel (RBTB) com o objetivo de identificar e eliminar gargalos tecnológicos

durante a evolução do PNPB (MME, 2016).

O Brasil é o segundo maior produtor e consumidor de biodiesel e sua origem se dá principalmente por soja, assim como nos EUA (ANP, 2016). Na Europa, maior produtora de biodiesel, as fontes são de colza e canola, especialmente na Itália, Suécia, Áustria, França e Alemanha (EBB, 2016).

### 3.4 Degradação abiótica

A estabilidade de combustível, biocombustível e blends está relacionada, principalmente com a composição química e as condições durante a estocagem, além da presença dos microrganismos. Dentre os fatores abióticos estão: a temperatura, a umidade, o oxigênio do ar e a foto-oxidação que afetam desde a fabricação até o uso em motores.

Há três níveis de temperatura encontrados durante o armazenamento de combustíveis, dependendo do caso. Baixos valores de temperatura ( $-5^{\circ}\text{C}$  até  $50^{\circ}\text{C}$ ) em tanques de estocagem; médios valores ( $50^{\circ}\text{C}$  até  $70^{\circ}\text{C}$ ) em sistemas de alimentação e altos valores (acima de  $90^{\circ}\text{C}$ ) em casos de proximidade do motor e bicos injetores (Hoshino, 2007; Atadashi, 2010). O biodiesel é mais afetado por estas variações, quando comparado ao diesel, e em baixas temperaturas ocorre a formação de cristais em biodieseis com altas taxas de saturações, indicando a perda de fluidez. Existem estudos com aditivos anticongelantes que interferem no crescimento de cristal de forma controlada (Reis *et al.*, 2013; Imdadul *et al.*, 2015).

O contato com a água através da umidade do ar ou com a água acumulada em tanques faz com que o biodiesel e diesel sofram hidrólise (quebra das ligações éster), liberação de radicais livres e aumento da acidez, sendo mais evidente em biodiesel que possui características mais higroscópicas (Knothe, 2006). Com isso, pode acontecer corrosão dos tanques, degradação de materiais poliméricos, falhas em sistema de injeção e formação de sedimentos e ferrugem (He, 2006).

A oxidação do biodiesel é um processo relacionado às insaturações dos ácidos graxos, resultando em formação de hidroperóxidos relativamente instáveis que se decompõem em radicais livres e levam ao aumento da acidez. A oxidação ocorre em maior grau no biodiesel com maior número de duplas ligações (Jain & Sharma, 2010). Como consequência, temos o aumento da viscosidade e origem de gomas e sedimento (borra abiótica) que causam entupimento de filtros e sistemas de injeção,

escurecimento e desenvolvimento de odor (Knothe, 2010; Yaakob *et al.*, 2014).

O uso de antioxidantes vem sendo empregado para diminuir estes problemas e elevar o tempo de armazenamento (Ribeiro *et al.*, 2007; McCormick & Westbrook, 2009; Sorate & Bhale, 2015). Os antioxidantes sintéticos mais utilizados são o TBHQ (terc-butil-hidroquinona), BHT (butil-hidroxitolueno) e tocofenol (Domingos *et al.*, 2007). Ainda, há estudos com antioxidantes naturais como o cardanol (castanha de caju) e eugenol (cravo da Índia) (Rodrigues Filho *et al.*, 2009).

### 3.5 Degradação biótica

Quando a participação microbiana provoca impactos e consequências negativas, o processo é denominado biodeterioração. Este conceito se aplica ao cenário de armazenamento e transporte incorreto de combustível, pois a atividade microbiana pode comprometer a integridade e qualidade final do produto (Bento, 2001; Soriano *et al.*, 2015). No caso de impactos positivos, a participação microbiana na degradação dos compostos poluentes recebe a designação de biorremediação, que ocorre por exemplo, durante a biodegradação dos compostos encontrados em derramamentos de óleo ou petróleo cru no oceano ou em solo (De Mello *et al.*, 2007; Zanaroli *et al.*, 2010; Pi *et al.*, 2016).

Os primeiros registros de biodeterioração de combustíveis foram com querosene de aviação (Bakanaukas, 1958; Gutheil, 1986). Dentre as principais consequências da biodeterioração de combustíveis estão: produção de biomassa e sólidos visíveis (entupimentos e saturação prematura de filtros). Estas podem comprometer a qualidade final do combustível, causar alterações das propriedades químicas, formar compostos solúveis e insolúveis, reduzir a vida útil do motor e causar corrosão dos tanques e vazamento para o ambiente (Allsopp *et al.*, 2016).

A composição do combustível pode determinar o grau de suscetibilidade à contaminação microbiana e, conseqüentemente, à degradação. Ao exemplo do diesel, podemos destacar o percentual de aromáticos e tamanho da cadeia carbônica, destacando que cadeias entre C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> são mais facilmente degradadas pelos microrganismos (Batts & Fathoni, 1991; Gaylarde, 1999; Pepperet *et al.*, 2011). O biodiesel, composto por ésteres de ácidos graxos, se torna ainda mais suscetível que o diesel à degradação microbiana. Maiores detalhes serão apresentados no tópico 3.5.4.

Um outro aspecto determinante a ser considerado durante o armazenamento é a presença de água (Bento *et al.*, 2010; Passman, 2013; ASTM 2014; Beker *et al.*, 2016). Os esporos de fungos e bactérias que antes poderiam estar dormentes veiculados no próprio combustível, desenvolvem-se quando entram em contato com a água. A água pode entrar no sistema principalmente pela condensação nas paredes do tanque, através do metabolismo microbiano, durante os processos de limpeza do sistema de armazenagem e vazamentos pelo sistema de vedação do tanque. Na Figura 3 são demonstradas as diferentes formas em que a água pode ser encontrada em um tanque de armazenagem aéreo: na forma dispersa, emulsionada ou livre no fundo do tanque (água de lastro).

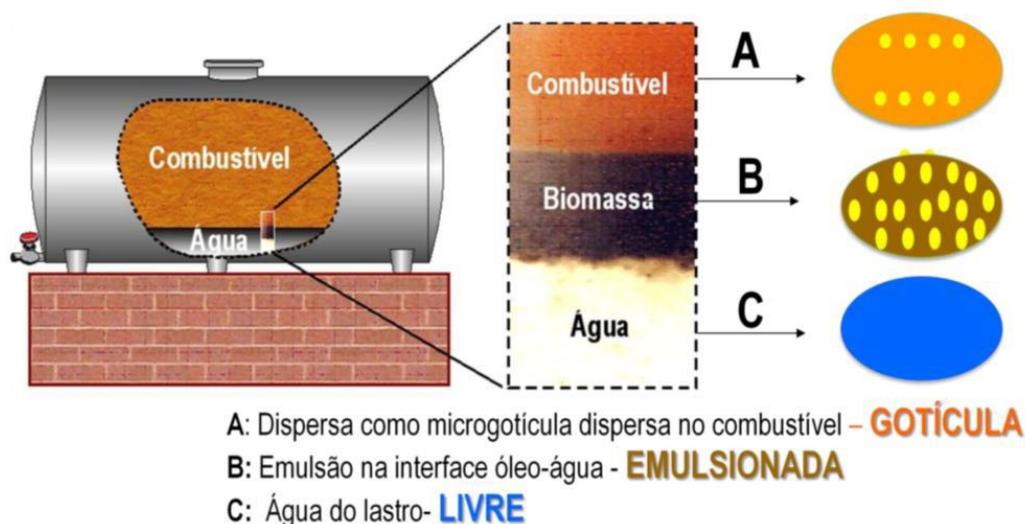


Figura 3. Representação das formas em que a água pode ser encontrada nos tanques de combustível. Fonte: Bento *et al.*, 2016.

O combustível é o principal veículo carreador de microrganismos. Logo após o processo de produção, o combustível naturalmente entra em contato com bactérias e fungos presentes no ar, na poeira, nas paredes dos tanques e na água durante seu transporte e armazenagem. O nível de contaminação microbiana pode aumentar ao longo da cadeia de distribuição (Jakeria *et al.*, 2014).

Bactérias aeróbias, leveduras e fungos filamentosos, uma vez em condições favoráveis, podem desenvolver-se, formando uma biomassa presente na interface óleo-água. Os diferentes aspectos do fungo filamentoso *Pseudallescheria*

*boydii* após o crescimento em meio de cultura (rico em nutrientes) e com a mistura B10 sem agitação em frascos de vidro a 30°C podem ser observados na Figura 4. As imagens mostram a biomassa produzida, nas condições ideais como a de um caldo de cultura (Figura 4C) e com a mistura B10 e uma fase aquosa (Figura 4A e B).



Figura 4. Aspecto de biomassa de fungo filamentosos. (A) Contato com B10 e meio mineral por 60 dias (B) Contato com B10 e meio mineral por 90 dias (C) Contato com caldo malte por 30 dias. Fonte: Gabriela Boelter, 2016

Os fatores limitantes para o desenvolvimento microbiano durante a estocagem são a temperatura, oxigênio e pH. Alguns estudos mostram que os microrganismos encontrados nessas situações são tolerantes a grandes variações de temperatura e pH (Chung, 2000). Temperaturas entre 20 °C e 30 °C são ideais para seu desenvolvimento, porém, há relatos de seu crescimento em 4°C ou 60°C (Passman, 2013; Allsopp *et al.*, 2016). Quanto ao pH encontrado na água dos tanques é de 3 a 9, sendo que a maioria das bactérias cresce em pH neutro e fungos em pH mais ácido, podendo sobreviver alternativamente a outras variações (Passman, 2003; Bento *et al.*, 2005). O acesso ao oxigênio pode favorecer o crescimento de microrganismos aeróbios, assim como a indisponibilidade favorece o crescimento dos aeróbios facultativos ou anaeróbios, como as bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Rajasekar *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2015).

A fonte de carbono e demais nutrientes para crescimento celular estão disponíveis nos hidrocarbonetos do diesel, nos ésteres e gliceróis do biodiesel e nas diversas fontes de carbono dos combustíveis, assim como produtos de degradação abiótica e/ou biótica. Também podem ser utilizados os compostos voláteis do combustível (VOCS) e nutrientes inorgânicos como fósforo, potássio, magnésio, cálcio e nitrogênio provenientes de aditivos, contaminantes, resíduos ou água (Passman, 2003; Das & Chandran, 2010).

A corrosão dos tanques pode ocorrer pela presença de água acumulada e

é acelerada devido aos metabólitos ácidos produzidos pelos microrganismos e a presença dos biofilmes, provocando perfuração dos tanques e vazamento do combustível para o ambiente (Bento *et al.*, 2004, 2005; Cavalcanti, 2009; Lee *et al.*, 2010).

Para evitar os riscos de contaminação microbiana, algumas práticas preventivas podem ser realizadas. Dentre elas está a drenagem diária da água de lastro, conforme estabelecido na Norma ABNT NBR 15.512 e utilização de produtos biocidas (Passman, 2003). Outras orientações foram disponibilizadas pela ANP no Guia de Manuseio e Armazenamento de óleo diesel B (2010) como a aquisição e uso da garantia de contínua renovação do conteúdo dos tanques de estocagem para limitar a presença de combustível envelhecido. O monitoramento da contaminação pode ser outra forma de mitigar o problema (Hill & Hill, 2009; Klinkson, 2009; Bento *et al.*, 2010; 2016).

### 3.5.1 Enzimas Oxigenases

Na etapa de degradação dos combustíveis fósseis, como o diesel, em situações aeróbias, destacamos o processo de oxidação em que ocorre a incorporação de oxigênio ao combustível, em que torna o hidrocarboneto mais solúvel em água e gera sítios reativos na molécula para que ocorram mais reações. As enzimas responsáveis são as oxigenases, que são divididas em mono e dioxigenases. As monoxigenases incorporam um átomo de oxigênio ao substrato e o outro átomo é reduzido à água, resultando em um álcool primário. As dioxigenases, por sua vez, catalisam a incorporação de dois átomos de oxigênio ao substrato, formando um hidroperóxido, delineando as rotas metabólicas básicas para a degradação de alcanos. Como resultado das duas vias temos a produção de um ácido graxo primário. A via mais comum para catabolizar os ácidos graxos é a de  $\beta$ -oxidação que cliva dois fragmentos de carbono consecutivos. Estes fragmentos são removidos pela coenzima A como acetil-CoA, a qual entra no ciclo do ácido tricarbóxico para mineralizar a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (Das & Chandran, 2010; Pepperet *et al.*, 2011). A composição dos principais grupos destas enzimas encontra-se na Tabela 1.

Existem diversos genes relacionados às oxigenases que foram detectados em eucariotos e procariotos. Dentre estes genes, está o de citocromo P450. O Citocromo P450 (CYP, P450 ou CYP450) é uma superfamília ampla e diversificada

de proteínas responsáveis por oxidar um grande número de substâncias para torná-las mais polares e hidrossolúveis. A reação mais comum catalisada pelo citocromo P450 é a de monoxigenase (Figura 5).

Tabela 1. Enzimas relacionadas à degradação de alcanos. Fonte: Adaptado de Jan B. van Beilen, 2007.

Classe de enzima	Composição e cofatores	Substratos específicos	Microrganismos	Referências
<b>Alk-B alcano hidroxilase</b>	Hidroxilase de membrana, FAD, NADH	Alcanos C5-C16, alquilbenzenos, cicloalcanos	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i>	Van Beilen et al. (2003)
<b>P450 eucariotos (CYP52, Classe II)</b>	Oxigenase microssomal, P450 heme redutase, FAD, FMN, NADPH	Alcanos C10-C16	<i>Candida maltosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolitica</i>	lida et al. (2000)
<b>Sistema de oxigenase P450 bacteriano (CYP153, Classe I)</b>	P450 oxigenase, P450 heme ferredoxina, FAD, NADH	Alcanos, C5-C16, cicloalcanos, alquilbenzenos	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Rhodococcus</i>	Van Beilen et al. (2006)

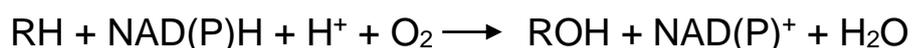


Figura 5. Reação dependente de citocromo P450. Fonte: Adaptado de Cresnar, 2011.

A família CYP52 de genes está envolvida na hidroxilação terminal de alcanos e já foi identificada em algumas espécies de *Candida* (Seghezzi *et al.*, 1991;

Van Bogaert *et al.*, 2009). Os álcoois resultantes que são convertidos em ácidos graxos entram na via de  $\beta$ -oxidação (Eirich *et al.*, 2004). A proteína integral de membrana, CPR (Citocromo P450 redutase) é essencial para as reações mediadas por CYP e é responsável pela doação de dois elétrons para a ativação do oxigênio molecular no sistema classe II, a qual está relacionada ao metabolismo primário microbiano e à hidroxilase de *n*-alcanos e ácidos graxos (Durairaj *et al.*, 2016).

Muitos microrganismos podem utilizar os *n*-alcanos como fonte de energia e carbono, pois possuem similaridade em sua estrutura com ácidos graxos e parafinas de plantas e são os hidrocarbonetos mais facilmente biodegradados (Pepper *et al.*, 2011). Entretanto, mostrando que existem espécies que são capazes de degradar compostos mais recalcitrantes, um estudo reportou uma monoxigenase relacionada ao P450 no fungo *Phanerochaete chrysosporium* capaz de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Syed *et al.*, 2010). Em pesquisa de Gunasekaran *et al.* (2014), um gene de P450 na bactéria *Achromobacter xylosoxidans* (isolada de solo contaminado com gasolina) foi identificado e sua expressão gênica acompanhada ao degradar etil tert-butil éter e metil tert-butil éter.

### 3.5.2 Enzimas Lipase e Esterase

As enzimas envolvidas com a degradação de biodiesel são do grupo das hidrolases, que incluem as lipases e esterases. As lipases catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilglicerídeos de substratos insolúveis em água, enquanto as esterases agem em substratos solúveis em água, como ésteres de ácidos graxos de cadeias curtas e triglicerídeos com cadeias de até C6 (Meyer, 2011).

A principal rota para a biodegradação do biodiesel inicia na hidrólise do etil ou metil éster por lipases produzindo ácido graxo e álcool. Os ácidos graxos são oxidados via  $\beta$ -oxidação. Então, os ácidos graxos são oxidados e degradados em ácido acético e ácido graxo com dois carbonos a menos. Ocorre a conversão em éster coenzima A. O éster-CoA é oxidado na posição  $\beta$  e dois átomos de carbono do final da molécula são clivados para produzir a acetil-CoA (Chapelle, 2001). As lipases fazem parte do grupo das carboxilesterases (Figura 6).

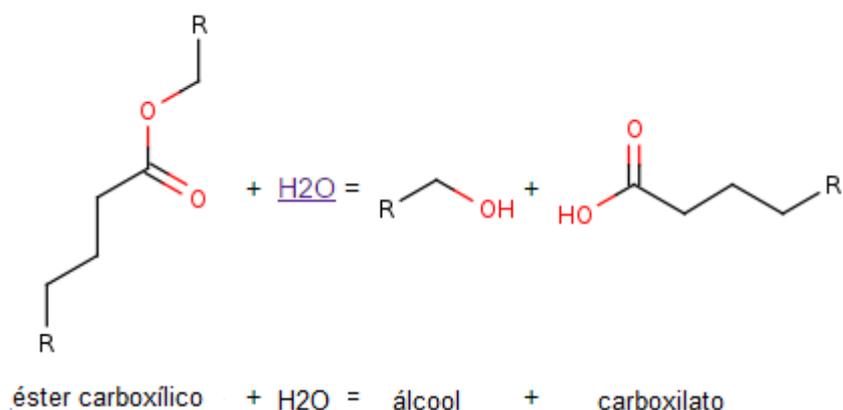


Figura 6. Reação catalisada por carboxilesterase. Fonte: BRENDA-Enzymes, 2016

Pesquisas referentes à produção de enzimas tais como amilase, protease e celulase por microrganismos apresentaram cerca de 34 espécies de fungos isoladas de ambiente contaminado com resíduos de fábricas de óleo comestível. Os isolados também foram testados quanto a produção das diferentes enzimas extracelulares, dentre elas, a lipase. Alguns gêneros que demonstraram produção de lipase foram: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces* e *Penicillium* (Gopinath *et al.*, 2005). Em estudo de Nguyen e colaboradores (2010) foram identificados genes codificantes para lipase em *Fusarium graminearum* e sua atividade lipolítica de degradar óleos foi comprovada pela utilização de meios com Rodamina B. A expressão dos genes foi avaliada por RT-PCR. A expressão de lipase produzida por *Aspergillus niger* responsável por degradação de polímeros foi determinada em pesquisa de Nakajima-Kambe e colaboradores (2012). Ainda, estudos anteriores e alguns pioneiros, podem ser referência para a compreensão do uso e produção de lipases por fungos (Rapp & Backhaus, 1992; Martinelle *et al.*, 1995; Sugihara *et al.*, 1995; Toida *et al.*, 2000; Cardenas *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 2002).

### 3.5.3 Biossurfactantes e bioemulsificantes

Os compostos com características surfactantes ou emulsificantes contribuem para a degradação de óleos e combustíveis, pois os tornam mais disponíveis para captação e metabolismo dos microrganismos. Microrganismos, plantas e alguns animais produzem estas substâncias.

Os biossurfactantes, em sua grande parte, são produtos de baixo peso molecular compostos por açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e grupos funcionais

como ácido carboxílico. Essas moléculas são anfifílicas e/ou anfipáticas e permitem dissolver solventes polares e apolares (Perfumo *et al.*, 2009; Satpute *et al.*, 2010). Os biossurfactantes são capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial entre diferentes fases. Pelo fato de possuírem uma porção polar e outra apolar, conseguem reduzir a energia livre do sistema pela transferência de moléculas de alta energia do interior de uma solução para a interface. Podemos atribuir o conceito de baixa concentração micelar (CMC) aos surfactantes com maior eficiência. CMC é definida como a concentração mínima necessária para iniciar a formação micelar (Mulligan, 2005; Bento *et al.*, 2008).

Os bioemulsificantes também são moléculas anfifílicas, mas possuem alto peso molecular e são formados por heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas (Perfumo *et al.*, 2009; Sekhon-Randhawa, 2014). Têm o potencial de emulsificar dois líquidos imiscíveis e estabilizar a emulsão mesmo em baixas concentrações, porém, é menos efetivo na redução da tensão superficial (Monteiro *et al.*, 2010). O uso de bioemulsificantes pode ser aplicado em casos de remediação de derrames de óleo na água e no solo; limpeza de navios e maquinarias contaminados com óleo; remoção de metais pesados (Monteiro *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2012; Panjiar *et al.*, 2014); formação de emulsões estáveis em alimentos e cosméticos (Campos *et al.*, 2014); e atividades terapêuticas (antimicrobiana, antifúngica, etc.) (Ahmed & Hassan, 2013).

Foram propostas duas maneiras de produção de biossurfactantes e bioemulsificantes e de captação pelas células microbianas: produção extracelular e captação pelo contato com microgotículas presentes na fase aquosa; produção associada à parede celular e captação pelo contato das células com o composto orgânico por modificações celulares como a hidrofobicidade celular ou fímbrias (Bento *et al.*, 2008). Sajna (2015) publicou um estudo com espécies de *Pseudozyma* capazes de produzirem biossurfactantes e degradarem diesel e querosene. Ayed (2015) mostrou essa capacidade com *Bacillus amyloliquefaciense*, sendo que o surfactante produzido mostrou potencial em ser uma alternativa aos sintéticos sendo estável a várias temperaturas e pH. Algumas das principais formas de produção de biossurfactantes são as associadas a crescimento celular e crescimento celular em condições limitantes (Fontes *et al.*, 2008).

#### 3.5.4 Suscetibilidade do biodiesel à biodegradação

Em relação à biodegradação, comparando-se ao diesel, o biodiesel é considerado mais suscetível por ser composto por ésteres de ácidos graxos. Estas moléculas são facilmente reconhecidas pelos microrganismos, pois podem ser encontradas no ambiente em plantas e animais. Um outro processo que pode ocorrer é o co-metabolismo, onde microrganismos com competência enzimática quebram estas moléculas primeiramente. Assim, outros microrganismos que não são capazes de utilizar as frações do combustível ou biocombustível disponíveis podem degradar fragmentos já degradados ou metabolizar outros compostos disponíveis (Bento *et al.*, 2016).

A presença de água é um fator limitante para o desenvolvimento dos microrganismos. O biodiesel apresenta grande higroscopicidade, contribuindo para a proliferação microbiana. Neste sentido, a natureza intrínseca do biodiesel tem mostrado que pode absorver de 10 a 15 vezes mais água que o diesel (1500 a 1980 mg.kg<sup>-1</sup>). A máxima saturação de água em B100 é de 1840 mg.kg<sup>-1</sup>, em B20 é de 270 mg.kg<sup>-1</sup> e para B5 é de 150 mg.kg<sup>-1</sup>. (Fregolente *et al.*, 2012). Srivastava & Prasad (2000) observaram que o biodiesel que contém alto teor de mono e diglicerídeos pode absorver mais água do que aqueles compostos apenas por metil ésteres.

Diversos experimentos desenvolvidos observaram o impacto das diferentes misturas de diesel e biodiesel na formação de biomassa. Bücken *et al.* (2011) avaliaram o potencial de espécies fúngicas em degradar preferencialmente o biodiesel puro e as misturas com maiores teores de biodiesel. Zimmer *et al.* (2013) utilizaram borra microbiológica proveniente de biodiesel e diesel puros, B4 e B5 para testar a ação de diferentes biocidas.

A matéria-prima da qual é feita o biodiesel também pode ser determinante para uma maior ou menor degradação microbiana. Óleo de colza contém 89% de ácidos graxos, sendo que 24,4% são poli-insaturados. Óleo de soja é composto por 80% de ácidos graxos no total e 56,6% são poli-insaturados. No óleo de coco, 74% de ácidos graxos são de C4 a C14 insaturados. Neste sentido, o comprimento da cadeia carbônica, o número e a posição de ligações duplas contribuem para a bioresistência dos ácidos graxos da matéria-prima que compõe o biodiesel (Knothe, 2005). Soriano *et al.* (2015) compararam a biodeterioração de B0, B100 de soja, B100

de sebo e respectivas misturas B5 por um consórcio microbiano de água de lastro (composto por espécies de *Bacillus*, *Candida* e *Pichia*). O estudo mostrou maior atividade microbiana nos combustíveis derivados de sebo por sua natureza de maior saturação.

### 3.6 Estudos dos fungos deteriorogênicos *Pseudallescheria boydii* e *Meyerozyma guilliermondii*

Os fungos deteriorogênicos selecionados para este estudo estão registrados em ampla literatura. Ambos podem ser encontrados em casos clínicos, assim como em amostras ambientais. *Pseudallescheria boydii* é um agente patogênico que pode causar hialohifomicose (crescimento de hifa septada no tecido atingido) e é comumente encontrado afetando o sistema nervoso central, pulmões e ossos (Rainer *et al.* 2005; 2006). Podemos nos referir a este como *Scedosporium apiospermum* (anamorfo) (NCBI - National Center for Biotechnology Information). É encontrado principalmente em locais com atividade humana, como áreas urbanas e industriais e solo agrícola (Rainer *et al.*, 2005). Em 2014 foi isolado de solo de cultivo agrícola, identificado e caracterizado morfológicamente (Babu *et al.*, 2014). Janda-Ulfig *et al.* (2008) avaliaram diferentes isolados de lama de esgoto e de pacientes infectados quanto ao crescimento em agar contendo tributirina, óleo de colza, biodiesel e diesel. A capacidade de degradar hidrocarbonetos alifáticos direcionada à biorremediação de solo contaminado foi explorada por Covino *et al.* (2015).

Os primeiros registros de biodegradação de óleo causada por *P. boydii* são datados de 1968, 1980 e 1998. Markovetz *et al.* (1968) avaliaram a assimilação de alcanos pelo fungo e Bilai *et al.* (1980) avaliaram o crescimento de fungos em hidrocarbonetos. April e colaboradores (1998) isolaram cepas de solo contaminado com óleo e esgoto e foi analisada a habilidade de degradação de hidrocarbonetos. Algumas cepas se mostraram eficientes em degradar os alifáticos lineares e n-alcanos voláteis. Outro relato foi de contaminação microbiana em combustíveis estocados, sendo isolados diferentes fungos e bactérias (Gaylarde *et al.*, 1999). Outros estudos de 1998 e 1999 referem-se a *Scedosporium apiospermum* e degradação de diferentes compostos de origem oleosa (Claußen *et al.*, 1998; 1999). Em 2006 foi publicado que *P. boydii* foi encontrado em abundância em solo contaminado com petróleo (Ulfig *et al.*, 2006). Outros estudos podem ser encontrados citando *P. boydii* e suas aplicações

(Ko *et al.*, 2010; Cazarolli *et al.*, 2012, 2014; Kraková *et al.*, 2016).

*Meyerozyma guilliermondii* (anamorfo *Candida guilliermondii*) é um fungo leveduriforme causador de algumas patogenicidades como a candidíase. É frequentemente isolado de solo, plantas, insetos, e faz parte da microbiota saprofítica dos humanos na pele e nas mucosas.

Uma das primeiras referências sobre o crescimento em diesel foi em 1977. Hiss e colaboradores exploraram a influência do pH no crescimento em meio aquoso contendo diesel. Em 1984, Borzani & Hiss relacionaram o consumo e concentração de nitrogênio e concentração celular em cultivo da levedura em diesel. Posteriormente, foi feito estudo da degradação de diesel em solos arenosos por microrganismos envolvendo esta espécie de levedura, resultando na degradação de n-alcanos e isoalcanos (Grundmann & Rehm, 1991). Em 1999, *M. guilliermondii* foi isolada de tanques de armazenamento de combustíveis como gasolina, querosene de aviação e diesel (Gaylarde *et al.*).

A capacidade de *C. guilliermondii* crescer em diferentes proporções de diesel em relação à uma fase aquosa (0,5%, 2%, 5%, 10% e 25%) foi proposta por Rodríguez-Rodríguez e colaboradores (2010). Uma cepa desta espécie mostrou maior crescimento em 25% e outra em 2%. De França e colaboradores (2009) compararam os percentuais de degradação de B10, B20 e B30 em pH 4,0, 5,0 e 7,0. O melhor resultado foi em B10 e pH 7,0. Em 2014, foi investigada a eficiência da bioaugmentação em solos contaminados com diesel. A degradação do óleo foi eficiente com a inoculação de uma comunidade microbiana contendo *C. guilliermondii* (Liu *et al.*). Um estudo identificou *M. guilliermondii* como uma das cepas isoladas de petróleo com potencial de degradação e apresentou 45,8% de degradação do petróleo em sua condição ótima (Ma *et al.*, 2015). Em outra pesquisa, a levedura foi isolada de resíduos de refino do petróleo (Goulart *et al.*, 2014). Ainda, há pesquisas explorando características desta espécie de levedura como produção de surfactantes, lipases e xilitol e degradação de fenol (Coimbra *et al.* 2009; Sitothy *et al.*, 2011; Sarubbo *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2014; Sarrouh *et al.*, 2009; Karimi & Hassanshahian, 2016).

#### 4. CAPÍTULO 1

### **Avaliação da capacidade deteriogênica de *Pseudallescheria boydii* durante estocagem simulada em diesel, biodiesel e mistura B10.**

Gabriela Boelter<sup>a</sup>, Juciana Clarice Cazarolli<sup>a</sup>, Sabrina Anderson Beker<sup>a</sup>, Patrícia Dörr de Quadros<sup>a</sup>, Ana Paula Guedes Frazzon<sup>a</sup>, Camila Correa<sup>b</sup>, Marco Flôres Ferrão<sup>b</sup>, Carolina Faganello Galeazzi<sup>b</sup>, Tânia Mara Pizzolato<sup>b</sup>, Fátima Menezes Bento<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, Universidade Federal do Grande do Sul, (Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brasil)

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (Avenida Bento Gonçalves 9500, Agronomia, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil)

## RESUMO

Os combustíveis derivados de petróleo são a principal fonte energética mundial. Alternativas sustentáveis para diminuir o impacto ambiental vêm sendo conduzidas na área de biocombustíveis. A natureza do biocombustível pode torná-lo mais suscetível à contaminação microbiana, devido a presença de ésteres de ácidos graxos, que são facilmente reconhecidos e degradados por alguns microrganismos. No Brasil, a mistura obrigatória atual do óleo diesel é B7 (ou seja, 7% de biodiesel adicionados à 93% de diesel). O objetivo do estudo foi avaliar o comportamento (crescimento, degradação e detecção de genes relacionados com a degradação de diesel puro (B0); biodiesel puro (B100) e a mistura B10 do fungo filamentoso *Pseudallescheria boydii* em meio mineral durante estocagem simulada. Foram esterilizados 30 mL de meio mínimo mineral BH em frascos de 150 mL. Foram adicionadas diferentes proporções (1:6, 2:3 e 2:1) de combustível (B0, B10 e B100) em relação a fase aquosa. A concentração do inóculo foi de  $10^4$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . Os frascos foram incubados a  $30^\circ\text{C}$  por 45 dias. Análises de pH, lipase, condutividade, tensão superficial, índice de emulsificação e crescimento fúngico foram realizadas aos 0, 10, 20, 30 e 45 dias. A detecção da presença de genes de Citocromo P450 e lipase foi realizada por PCR. A avaliação da degradação dos combustíveis foi realizada por espectroscopia de infravermelho (IV), RMN  $\text{H}^1$  e  $\text{C}^{13}$ . Metabólitos na fase aquosa foram detectados por GC-MS. Os menores valores de pH foram de 4,96 (B10, proporção 2:1, tempo 30 dias) e de 5,97 (B100, proporção 1:6, tempo 30 dias) comparados ao pH inicial de 7,2. Controles não mostraram diferenças significativas. Placas contendo ágar tributirina apresentaram resultados positivos para lipase após 20 dias de incubação. As medidas de condutividade diminuíram aos 20 dias em todos combustíveis, voltando a aumentar após este período. Em tensão superficial, apenas em B10 o tratamento com inóculo ( $48,59 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) mostrou diferença significativa com o controle ( $44,05 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Não se observou emulsão em nenhuma das condições do experimento. Após 45 dias de experimento, observamos maior crescimento em B10 com 1.203 mg de biomassa. O crescimento entre as três proporções não mostrou diferenças significativas. Foi detectada a presença de genes relacionados ao Citocromo P450 e à lipase. Os resultados de IV da fase oleosa foram obtidos pela análise da região  $1800\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$  do espectro. Os espectros de B10 (menor proporção de óleo/água) do tempo final que indicam a degradação da região da carbonila foram mais evidentes que de B100. Com RMN  $\text{C}^{13}$  verificamos o produto de degradação como ácido carboxílico. Pelo RMN  $\text{H}^1$  em B0, houve uma mínima degradação dos compostos metila e etileno e os compostos aromáticos não foram degradados. Os principais compostos identificados por GC-MS na fase aquosa foram álcoois, ésteres, ácidos, sulfurados, cetonas e fenóis. Os resultados evidenciaram que *Pseudallescheria boydii* cresceu ao longo do tempo às expensas dos combustíveis, com degradação dos ésteres do biodiesel e dos hidrocarbonetos do diesel, e metabólitos como ácido nonanóico, ácido dodecanóico e ácido pentadecanóico foram identificados.

## 4.1 INTRODUÇÃO

As pesquisas com biocombustíveis vêm aumentando devido à preocupação com os impactos negativos que os combustíveis fósseis causam. Após a introdução de proporções do biodiesel ao diesel, este combustível foi separado em duas classes: A (sem adição de biodiesel) ou tipo B (com adição de biodiesel). Atualmente, essa proporção no Brasil é de 7% de biodiesel adicionado ao diesel (B7) (ANP, 2016). O biodiesel puro utilizado no Brasil é composto por metil ésteres de cadeias longas de ácidos graxos derivado da transesterificação de óleos vegetais (de soja, algodão, macaúba, entres outros) ou gorduras animais (gado, suína, de frango) para ser utilizado nos motores de ignição e compressão.

A composição do biodiesel o torna mais suscetível à biodeterioração. A diversidade microbiana encontrada em tanques de estocagem de combustíveis e biocombustíveis envolve bactérias, fungos e arqueas (Passman, 2003). A produção de enzimas e substâncias surfactantes por estes microrganismos é essencial para que a biodeterioração ocorra e os carbonos dos combustíveis sejam degradados e assim, metabolizados. Entre estas enzimas estão as oxigenases (envolvidas no processo de ativação e incorporação de oxigênio ao substrato) e esterases ou lipases (atuam primeiramente no catabolismo dos ésteres realizando a hidrólise do metil ou etil éster) (Pepper *et al.*, 2011). Já os biosurfactantes diminuem a tensão superficial e tornam o substrato disponível para o microrganismo (Perfumo *et al.*, 2009).

A biodegradação de combustíveis interfere na sua qualidade final, prejudica equipamentos e peças e acarreta em entupimento de filtros devido à formação de biomassa na interface óleo-água. A água pode acumular-se no fundo de tanques e caminhões de transporte por infiltração. Esta pode ocorrer por problemas de vedação ou pela condensação da umidade nas paredes internas (Bento *et al.*, 2010; Passman, 2013; ASTM 2014).

A natureza microbiana do lodo biológico tem mostrado a importância da participação dos fungos filamentosos deteriorogênicos (Ulfig *et al.*, 2006; Bucker *et al.*, 2011). Fungos filamentosos são vantajosos quanto a este aspecto pela presença de hifas que aumentam a área de superfície, permitindo a penetração de

hidrocarbonetos e agregados carregados de hidrocarbonetos anóxicos internamente. O uso de ferramentas que avaliam o impacto do crescimento microbiano sobre o combustível, como a degradação de ésteres e hidrocarbonetos e a produção de metabólitos pelos microrganismos, pode auxiliar na adoção de medidas para mitigar os problemas derivados da contaminação microbiana. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade deteriogênica (crescimento, degradação e detecção de genes) relacionada com a degradação do diesel puro (B0), biodiesel puro (B100) e a mistura B10 de *Pseudallescheria boydii* em meio mineral durante estocagem simulada.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Combustíveis

O óleo diesel A (B0) com baixo teor de enxofre (10 ppm) utilizado para este estudo foi fornecido pela Petrobras e o biodiesel (B100) 100% soja foi fornecido pela Ipiranga Produtos de Petróleo S/A (Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil) (Anexos 9.1 e 9.2). A mistura diesel e biodiesel B10 foi preparada no LAB-BIO/UFRGS (Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis) utilizando-se proveta graduada previamente desinfectada com álcool 70% adicionando-se 10% de biodiesel em 90% de diesel. Esta proporção de biodiesel/diesel foi avaliada por ser a mistura mais próxima à da matriz energética brasileira atual (B7). Foram conduzidos tratamentos com diesel puro (B0), biodiesel puro (B100) e mistura B10.

### 4.2.2 Esterilização

Para a esterilização dos combustíveis utilizou-se frasco Kitassato previamente esterilizado em autoclave (121°C e 1 atm por 15 minutos). O diesel e biodiesel foram filtrados em membrana de celulose com porosidade de 0,22µm (Milipore) por sistema a vácuo e armazenados em geladeira (4°C) em frascos de vidro âmbar esterilizados.

### 4.2.3 Meio Mínimo Mineral

Como fase aquosa foi utilizado o meio mínimo mineral BH (Bushnell & Haas, 1941) em que a única fonte de energia e carbono para os microrganismos é o hidrocarboneto presente no diesel e biodiesel. É composto por água destilada e enriquecido com sais minerais com pH inicial de 7,2. O protocolo com os componentes encontra-se no Anexo 9.3.

### 4.2.4 Microrganismo

O fungo filamentoso utilizado, *Pseudallescheria boydii*, pertence ao Filo Ascomycota e à Família Microascaceae. Foi isolado de solo de *landfarming*, técnica de biorremediação de solo impactado com resíduos petroquímicos (Schultz, 2010). A identificação molecular foi realizada pela amplificação da região ITS-5.8S-ITS2 utilizando oligonucleotídeos iniciadores ITS-1 e ITS-4, seguida por sequenciamento

automático em Sistema AmershamMegaBACE 1000 com protocolos padrão do Brazilian Genome Network.

#### 4.2.5 Inóculo

Para o preparo do inóculo, o fungo foi semeado em tubos contendo ágar malte (Anexo 9.4) e mantido em estufa a 30 °C. Após 7 dias, foi adicionado 1 mL de Tween 80 (0,01%) e 2 mL de solução salina (0,85%) ao tubo e agitou-se brevemente. Em seguida foi feita raspagem com alça de platina para soltarem-se os esporos. Verteu-se o conteúdo em frasco estéril com capacidade de 150 mL contendo meio mínimo mineral BH e deixou-se sob agitação a 120 rpm, a 30 °C por 24 horas, com o intuito de esgotarem-se as reservas nutritivas do microrganismo. A concentração de  $10^4$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  foi estimada por contagem de esporos em câmara de Neubauer. Foi inoculada uma alíquota, com esta concentração final, de volume proporcional ao volume do conteúdo dos frascos do experimento.

#### 4.2.6 Condições de estocagem simulada com diesel, biodiesel e mistura B10 em diferentes proporções de fase oleosa e aquosa

Para os microcosmos, usados para simular a estocagem e transporte de combustíveis, foram utilizados frascos de vidro com capacidade de 150 mL. Foram determinadas 3 proporções diferentes de fase oleosa em relação à 30 mL de fase aquosa: 1:6 (5 mL de óleo); 2:3 (20 mL de óleo) e 2:1 (60 mL de óleo) a fim de avaliar se as diferentes alturas de coluna de óleo influenciam na dispersão de oxigênio e no crescimento do fungo (Figura 7). A fase aquosa foi composta por meio mineral Bushnell & Haas como descrito no item 4.1.3.

Para a montagem dos microcosmos, os frascos utilizados para o experimento foram autoclavados (121°C, 1 atm por 15 minutos) juntamente com o meio mineral Bushnell & Haas. Em câmara de fluxo vertical, foi adicionado o inóculo contendo  $10^4$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  aos frascos e em seguida, os combustíveis B0, B10 e B100 separadamente nas três diferentes proporções, nas condições de tratamento. Para as condições de controle, o microcosmo foi constituído de fase aquosa e oleosa referentes aos tratamentos, sem inóculo do microrganismo. Com o intuito de verificar se o fungo era capaz de crescer apenas com os minerais mínimos sem o aporte dos combustíveis e se causaria alguma mudança nesses componentes, foram montados

frascos apenas com o meio BH e inóculo.

O experimento foi realizado em quintuplicada para os frascos de tratamento e em triplicata para os frascos de controle com repetições destrutivas. Os frascos foram incubados em estufa a 30°C sem agitação pelo período de 45 dias com análises nos dias 0, 10, 20, 30 e 45.

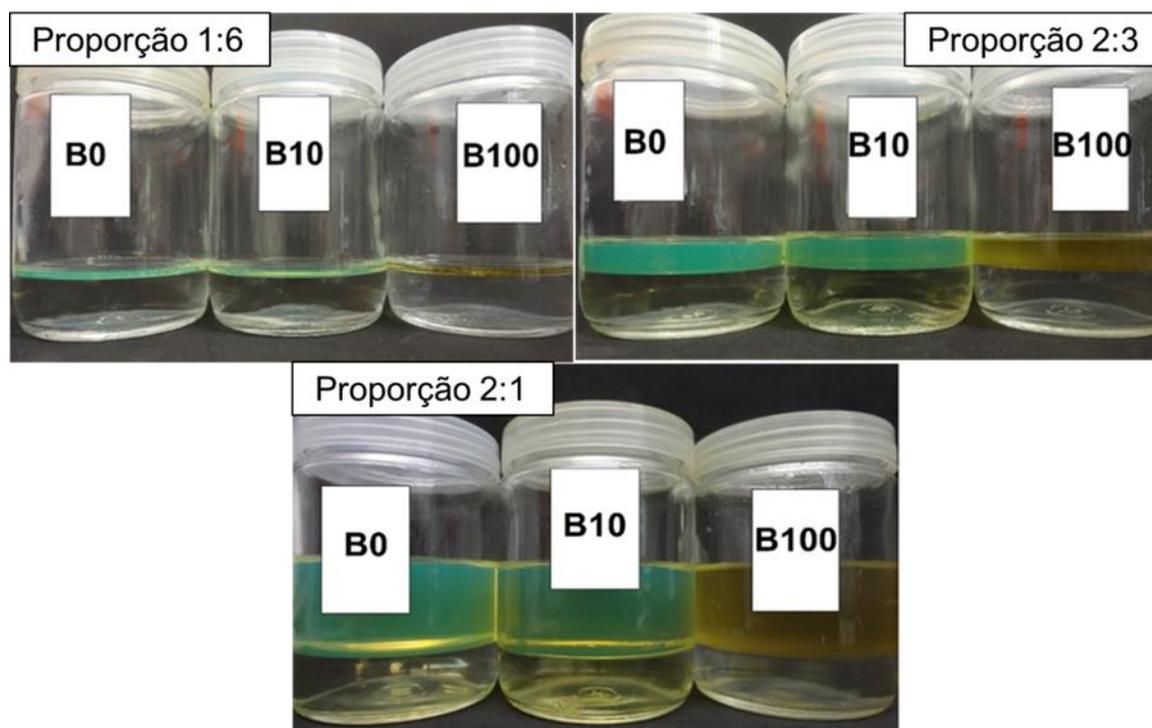


Figura 7. Aspecto do microcosmo contendo combustíveis B0, B10 e B100 nas proporções 1:6, 2:3 e 2:1 de fase aquosa e oleosa e meio mínimo mineral BH. Fonte: Gabriela Boelter, 2015.

#### 4.2.7 Coletas de fase oleosa, fase aquosa e biomassa

Nos tempos 0, 20 e 45 dias foi coletado em tubos de plástico 1 mL de fase oleosa próximo da interface óleo-água, com o intuito de detectar o máximo percentual de degradação pelo fungo. Para cromatografia gasosa, cerca de 2 mL de fase aquosa das amostras com menores valores de pH foram filtrados com membrana de PVDF (Fluoreto de polivinilideno) de 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenados em frascos de vidro com capacidade de 15 mL e tampas de silicone. A cada tempo amostral, todo o conteúdo restante do microcosmo foi separado em funil de separação de vidro com capacidade de 500 mL. Aproximadamente 25 mL de fase aquosa foram coletados em tubos de centrífuga para posteriores análises. A fase oleosa sobressalente foi descartada. A

biomassa formada era, então, transferida para membrana de papel filtro presente em frasco Kitassato.

#### 4.2.8 Quantificação de biomassa

Para acompanhar a formação de biomassa e realizar a curva de crescimento, utilizou-se o método gravimétrico (peso seco). Primeiramente, membranas de papel filtro (Unifil, gramatura 80, porosidade 14  $\mu\text{m}$ ) foram numeradas referente a cada frasco do experimento e submetidas a secagem em estufa a 60  $^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para remoção de umidade. Assim, foram pesadas em balança de precisão e mantidas em dessecador.

Em cada tempo amostral, a biomassa foi colocada na membrana em frasco Kitassato. Foram adicionados 3 mL de hexano e ligado o sistema a vácuo para remover o excesso de óleo presente na massa fúngica por filtração. Com o auxílio de uma espátula, a biomassa foi pressionada contra a membrana para ser retirado algum resquício de óleo, fase aquosa ou hexano. Em seguida, as membranas contendo a biomassa foram incubadas em estufa a 30  $^{\circ}\text{C}$  por 4 dias. Após este período, eram retiradas para pesagem. O cálculo para determinar o peso seco é definido por subtrair o peso final do peso inicial da membrana. A unidade utilizada é mg.

#### 4.2.9 Análises de fase aquosa

##### 4.2.9.1 Detecção da produção de lipase

Para esta análise foram utilizadas placas de Petri com ágar contendo tributirina (Anexo 9.5). Em alguns pontos das placas de Petri com o meio específico foram criados orifícios para a inoculação de uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de fase aquosa retirada dos frascos experimentais. As placas foram incubadas a 30  $^{\circ}\text{C}$  por 5 dias (Carrasco *et al.*, 2012). O resultado positivo foi observado pela formação de um halo translúcido ao redor do crescimento do fungo.

##### 4.2.9.2 Medidas de pH

Para a detecção da produção de metabólitos ácidos pelos microrganismos, realizou-se medidas de pH da fase aquosa, centrifugada a 1000 rpm por 15 minutos e em temperatura ambiente, em todos os tempos amostrais, com o auxílio de um

pHmetro Digimed.

#### 4.2.9.3 Microextração em fase sólida e Cromatografia gasosa

A amostragem por microextração por fase sólida-headspace (HS-SPME) foi realizada em frascos de vidro com capacidade de 15 mL e o volume de amostra de fase aquosa foi de 2 mL. Foi utilizada uma fibra de PDMS (Polidimetilsiloxano) e aquecimento a 60 °C por 5 minutos antes da exposição da fibra. O tempo de exposição da fibra foi de 15 minutos. As análises foram realizadas em triplicata por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS, Shimadzu, modelo QP-2010 SE) equipado com coluna VA-1 (60 m × 1 µm × 0,5 mm). A variação da temperatura está disposta na Tabela 2. Os compostos presentes na amostra foram tentativamente identificados por comparação dos seus espectros de massas com aqueles da biblioteca NIST.

Esta análise visa caracterizar a natureza dos metabólitos dos contaminantes envolvidos no processo de degradação, como metabólitos ácidos que podem causar a diminuição do pH do meio mineral ou ainda de compostos provenientes da migração da fase óleo. Foram analisadas apenas amostras em que se observou menor valor de pH afim de otimizar as análises pelo equipamento.

Tabela 2. Rampa de temperatura de GC-MS

Variação (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo (min)
-	70,00	2,00
10,00	200,00	5,00
10,00	270,00	8,00

#### 4.2.9.4 Medida de condutividade

A condutividade foi medida por condutímetro (Digimed – DM31) por eletrodo inserido nas amostras centrifugadas e em temperatura ambiente a fim de detectar o consumo dos sais minerais presentes no meio mínimo mineral da fase aquosa. Desta forma, foram tomadas medidas no início do experimento e em 10, 20, 30 e 45 dias.

#### 4.2.9.5 Tensão superficial

Com o intuito de detectar a produção de substâncias surfactantes pelo

fungo, em todos os tempos amostrais foi feita a medição de tensão superficial pelo método da Placa de Wilhelmy. Após as amostras em temperatura ambiente serem centrifugadas (6000 rpm por 15 minutos), separou-se 10 mL para a análise. Foi utilizado um medidor de tensão superficial digital (Gibertini, Milão, Itália). Os valores de calibração utilizados são  $72,0 \text{ mN m}^{-1}$  para água destilada e  $24,0 \text{ mN m}^{-1}$  para etanol.

#### 4.2.9.6 Índice de emulsificação ( $IE_{24}$ )

Com o intuito de detectar a produção de substâncias emulsificantes, foi realizada a medida do índice de emulsificação, que é determinado pela adição de 2 mL da fase aquosa centrifugada à 2 mL de fase oleosa em tubos de ensaio com fundo chato (Bento *et al*, 2008). Foram acrescentados 200  $\mu\text{L}$  de solução 0,05% de rosa de bengala com o objetivo de ressaltar a possível emulsificação formada. Desta forma, a mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e os frascos mantidos em repouso por 24 horas. Após esse período, o índice de emulsificação (%) é obtido pela medida da coluna emulsificada dividida pela altura total (4 mL) e multiplicada por 100 (Cooper & Goldenberger, 1987).

#### 4.2.10 Análises da fase oleosa

##### 4.2.10.1 Espectroscopia de infravermelho

As análises nos tempos 0, 20 e 45 dias para avaliar a degradação das cadeias carbônicas dos combustíveis foram realizadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR/ATR) em espectrofotômetro Cary 630 Agilent Technologies FTIR acoplado em acessório de reflectância total atenuada horizontal (HATR).

A faixa de  $1800$  a  $800 \text{ cm}^{-1}$  do espectro foi selecionada para a realização da análise por agrupamento hierárquico (HCA) empregando o PLS-Toolbox. Todos os espectros de ATR-FTIR foram suavizados, normalizados e aplicada a primeira derivada (algoritmo Savistky-Golay, 15 pontos, polinômio de segunda ordem).

##### 4.2.10.2 Ressonância Magnética Nuclear

Aproximadamente 15 mg para análise de hidrogênio e 70 mg para carbono da amostra de biodiesel foi solubilizada em 550  $\mu\text{L}$  de Clorofórmio-D 99,8%

(Cambridge Isotope Laboratories, EUA). Os espectros foram adquiridos em um equipamento da Bruker, 400 MHz. As condições de análise foram pulso 90° e tempo de relaxação de 3s. As amostras selecionadas apresentaram maior peso seco.

#### 4.2.11 Detecção de genes de degradação

##### 4.2.11.1 Extração de DNA

Após o crescimento do fungo por 7 dias em caldo malte (Anexo 9.6), foi utilizado papel filtro para secar a biomassa antes de iniciar o processo de extração de DNA. Para a extração de DNA foi aplicado o protocolo de CTAB (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Após a extração, foi realizada a purificação do DNA com MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fischer Scientific).

##### 4.2.11.2 Detecção de genes de Citocromo P450 e lipase

Os genes para citocromo P450 e lipase foram escolhidos neste estudo, pois estão envolvidos na degradação de hidrocarbonetos alifáticos e de ésteres. Para a detecção dos isolados que apresentavam o gene de *citocromo P450* foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores P450S *Forward*: 5'-GGYTNAARTTYAARGARTGGGC-3' e P450S *Reverse*: 5'-TTYTCDATRTGNCCRTARAARTG-3' que amplificam um fragmento de DNA de 292 pares de base (pb) a partir do DNA genômico. Para a detecção da carboxilesterase foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores CS *Forward*: 5'-CCNAYRYTNSAYMGNTTYGC-3' e CS *Reverse*: 5'-GTCCANGCCKYCCANKNNGGC-3' que amplificam um fragmento de 590 pb. Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir de fragmento do genoma de *Scedosporium apiospermum* (GenBank: KEZ39888.1 e KEZ39536.1) e *Colletotrichum fioriniae* PJ7 (NCBI XM\_007594966.1 e XM\_007599506.1) que codifica para os genes referentes à Cytochrome P450 e Carboxylesterase. O genoma de *S. apiospermum* foi utilizado para detectar a sequência de aminoácidos correspondente à enzima em estudo. Após ser traduzida para nucleotídeo, sua sequência foi alinhada com a região do genoma de *C. fioriniae* codificada para os genes alvo. Como controle positivo para ambos os genes foi utilizada uma cepa de *Scedosporium aurantiacum* pertencente à coleção LAB-BIO/UFRGS.

Para a detecção do gene Citocromo P450, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 25  $\mu$ L contendo: 100 ng de DNA, 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Ludwig), 3,0 mM de  $MgCl_2$  (Ludwig), 200  $\mu$ M de dNTPs, 0,4  $\mu$ M de cada oligonucleotideo (*forward e reverse*), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig) e água Milli-Q para completar a reação. As condições de amplificação foram 3 min a 94°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 51°C, 45 s a 72°C; seguidos por 4 min a 72°C. O produto de PCR esperado foi analisado por eletroforese em gel de agarose com marcador molecular de 100pb (Invitrogen) e visualizado sob luz ultravioleta (UV). O controle negativo teve adição de água na reação de amplificação, substituindo o DNA.

Para detecção do gene de carboxilesterase foram utilizados 1  $\mu$ L de DNA, 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Ludwig), 3,5 mM de  $MgCl_2$  (Ludwig), 200  $\mu$ M de dNTPs, 0,4  $\mu$ M de cada oligonucleotideo iniciador (*forward e reverse*), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig) e água Milli-Q para completar a reação. As condições de amplificação foram 3 min a 94°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, 45 s a 72°C; seguidos por 4 min a 72°C. O produto de PCR esperado foi analisado por eletroforese em gel de agarose com marcador molecular de 100pb (Invitrogen) e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

#### 4.2.12 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas de formação de biomassa, pH, condutividade e tensão superficial, foi utilizado o programa Excel XLSTAT 2015.1. Foram realizadas análise de variância e teste de Duncan a nível de 5% de significância em todos os tempos amostrais em quintuplicata. A análise por componentes principais (PCA) foi realizada para determinar a relação entre pH, biomassa e tensão superficial.

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Crescimento do fungo filamentososo em diesel, biodiesel e mistura B10

Avaliando o crescimento de *Pseudallescheria boydii* ao longo de 45 dias, observou-se a formação de biomassa nos tratamentos envolvendo os três combustíveis (B0, B10 e B100). Isolando apenas os tempos amostrais (0, 10, 20, 30 e 45 dias) para a análise, verificou-se que o crescimento fúngico foi crescente ao longo do tempo.

Comparando apenas os combustíveis, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias dos valores de biomassa de B0, B10 e B100 (19,95 mg, 108,47 mg e 66,13 mg, respectivamente) ao longo da curva de crescimento de 45 dias, ressaltando o maior peso seco do fungo em contato com B10 (Tabela 3). Analisando a média da biomassa das três proporções de fase oleosa/aquosa isoladamente, notou-se que a biomassa formada diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) ao longo da curva de crescimento entre a proporção 1:6 e demais proporções. Os resultados foram 166,6 para a proporção 1:6, 45,6 para a proporção 2:3 e 35,2 para a proporção 2:1.

Analisando apenas a influência das proporções de fase aquosa/oleosa no crescimento do fungo com **B0**, houve maior crescimento na proporção 1:6 (166,61 mg), seguido de 2:3 (45,57 mg) e 2:1 (35,23 mg) no tempo final. Desta forma, pode ser observado na figura 8 o aspecto dos microcosmos após 10 e 45 dias com a formação da biomassa, devido ao conjunto de hifas. Nos microcosmos contendo B0, foram verificados maiores valores de biomassa aos 10 dias em todas as proporções 1:6 (11,20 mg); 2:3 (24,40 mg) e 2:1 (36,50 mg), observando diferença significativa entre as três proporções.

Com **B10**, foi determinado maior peso seco entre as proporções aos 30 dias nas proporções 2:3 (213,33 mg) e 2:1 (130,67 mg) e aos 45 dias na proporção 1:6 (335,67 mg). Assim, foram constatadas diferenças significativas entre as proporções 2:3 e 2:1 no tempo 30 e entre a proporção 1:6 para as 2:1 e 2:3 no tempo 45.

Com **B100**, a maior formação de biomassa entre as proporções foi aos 30 dias em 1:6 (108,8 mg) e 2:3 (69,75) e aos 45 dias na proporção 2:3 (84,00 mg). O resultado não demonstrou diferença significativa entre as três proporções.

Tabela 3. Valores da biomassa (mg) do fungo *Pseudallescheria boydii* em proporções de fase oleosa e aquosa de 1:6, 2:3 e 2:1 em diesel B0, blenda B10 e biodiesel B100 e meio mínimo BH por 45 dias.

Combustível B0			Combustível B10			Combustível B100					
Tempo	1:6	2:3	2:1	Tempo	1:6	2:3	2:1	Tempo	1:6	2:3	2:1
<b>0</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	<b>0</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	<b>0</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>10</b>	11,2 ± 1,6	24,4 ± 2,7	36,5 ± 2,6	<b>10</b>	43,5 ± 0,7	39,4 ± 2,3	35,7 ± 1,0	<b>10</b>	65,0 ± 2,6	55,2 ± 3,1	59,8 ± 2,3
<b>20</b>	15,6 ± 1,3	21,5 ± 0,6	32,5 ± 0,6	<b>20</b>	138,3 ± 11,0	48,5 ± 2,9	92,0 ± 6,1	<b>20</b>	55,6 ± 8,6	50,4 ± 3,4	49,4 ± 2,9
<b>30</b>	13,6 ± 2,2	22,0 ± 4,0	26,0 ± 4,3	<b>30</b>	42,8 ± 3,6	213,3 ± 17,9	130,7 ± 6,4	<b>30</b>	108,8 ± 23,1	69,2 ± 11,0	69,7 ± 20,6
<b>45</b>	9,0 ± 1,8	13,0 ± 1,0	20,2 ± 3,3	<b>45</b>	335,7 ± 16,9	38,2 ± 2,6	45,0 ± 16,2	<b>45</b>	87,0 ± 25,2	84,0 ± 22,2	44,2 ± 6,2

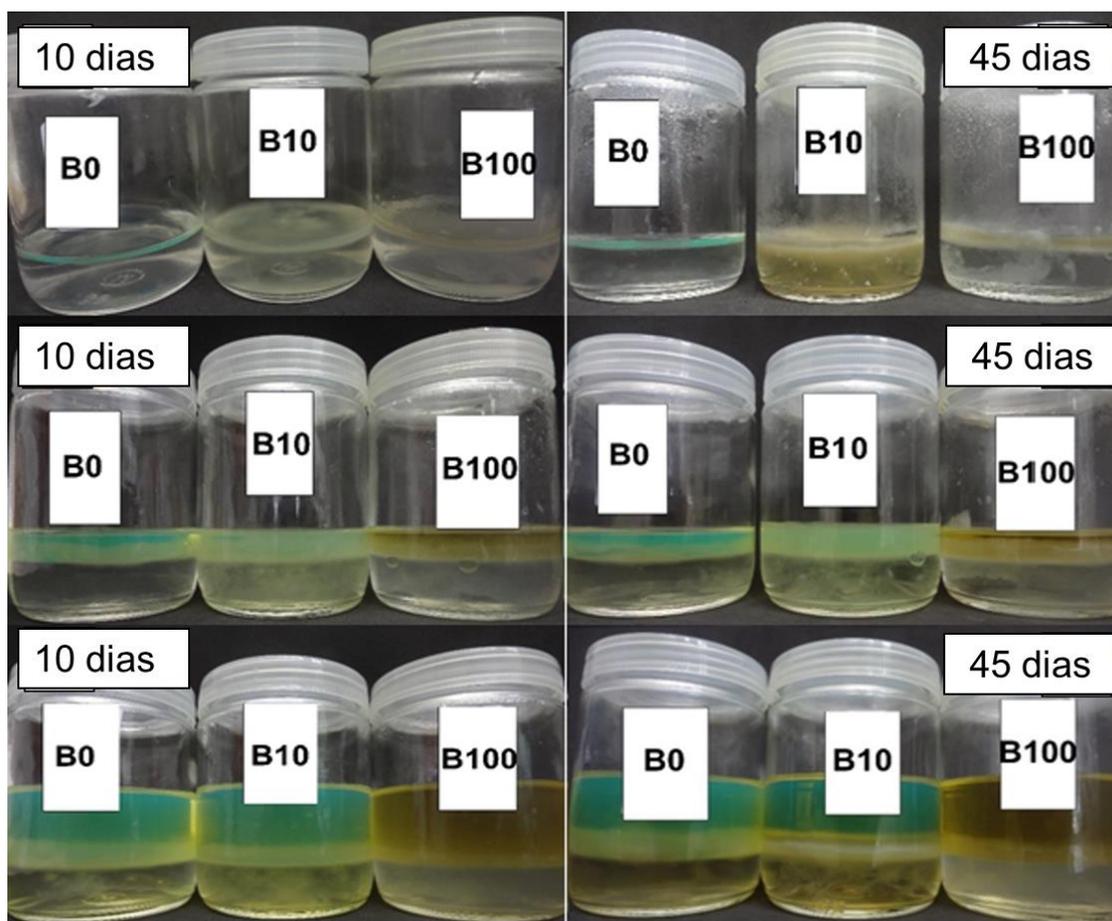


Figura 8. Aspecto dos microcosmos com combustível e meio BH nas proporções 1:6, 2:3 e 2:1 com inóculo aos 10 e 45 dias de incubação.

#### 4.3.2 Fase aquosa

##### 4.3.2.1 Monitoramento do pH

Ao analisar a produção de metabólitos ácidos ou básicos pelo fungo em estudo ao longo dos 45 dias, e isolando a variável combustível, observou-se que na presença dos combustíveis B0, B10 e B100, o meio mineral Bushnell-Haas apresentou uma redução em seu pH inicial de 7,2 para 6,91; 6,59 e 6,60, respectivamente, sem diferenças significativas em relação ao pH inicial e entre os combustíveis. Comparando-se apenas as proporções de fase oleosa/aquosa nos 45 dias, a proporção com o pH mais baixo foi 2:1 com valor de 6,47, seguida por 1:6 com valor de 6,57 e 2:3 com valor de 6,59, não diferindo estatisticamente entre as amostras.

Observando a fase aquosa em contato com B0, as menores medidas de pH foram observadas aos 45 dias nas proporções 2:1 (6,57), 2:3 (6,71) e 1:6 (6,74)

(Figura 9). Com o combustível B10 aos 30 dias, a fase aquosa na proporção 2:1 diminuiu o pH para 4,96, e na proporção 2:3 para 6,08. Aos 20 dias a proporção 1:6 diminuiu para 5,91. O combustível B100 apresentou menor pH no tempo 30 com valores de 6,25; 5,97 e 6,24 para as proporções 2:3, 1:6 e 2:1, respectivamente.

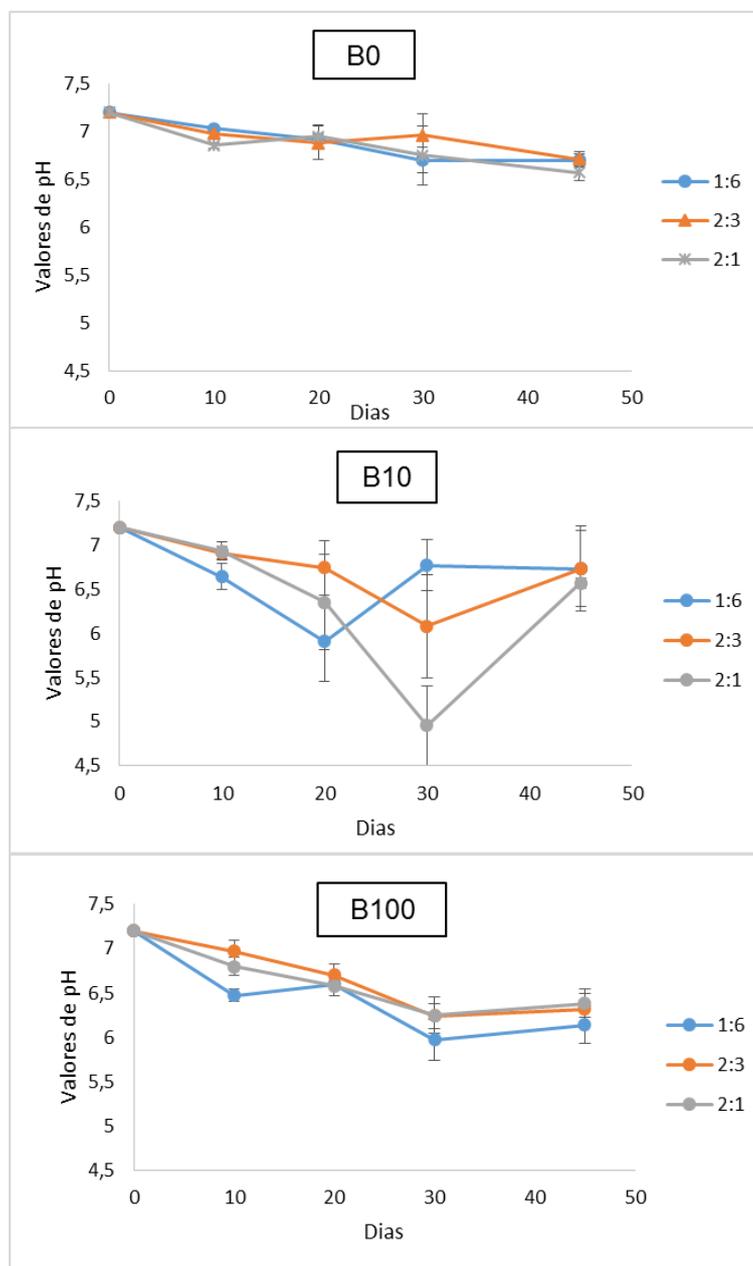


Figura 9. Medidas de pH ao longo de 45 dias do meio BH com inóculo e combustíveis B0, B10 e B100 em proporções de fase oleosa e aquosa de 1:6, 2:3 e 2:1.

Os tratamentos controles não mostraram redução significativa do pH quando comparados ao pH inicial (7,2), tanto nos microcosmos contendo combustível

e meio BH, quanto nos microcosmos contendo apenas meio BH e inóculo (Figura 10).

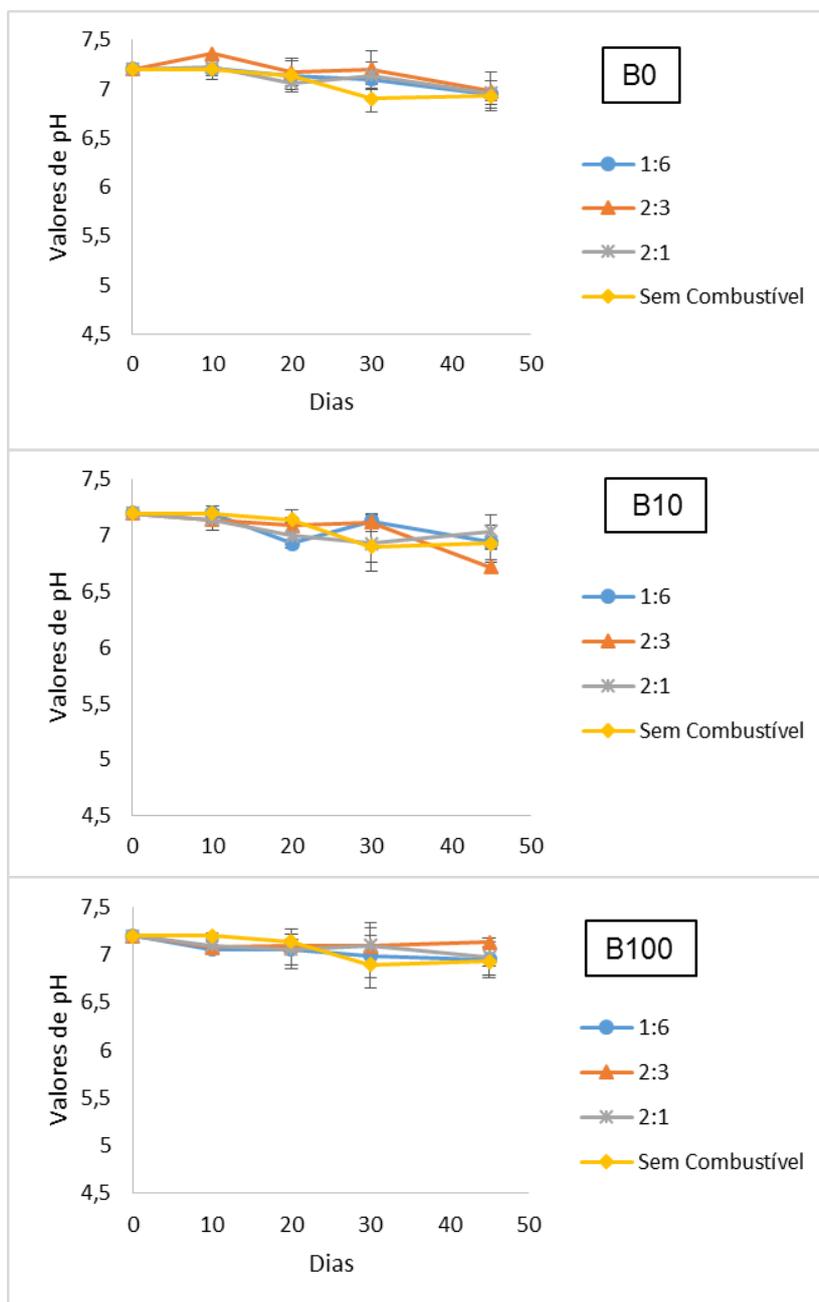


Figura 10. Medidas de pH ao longo de 45 dias dos controles do meio BH e combustíveis B0, B10 e B100 em proporções de fase oleosa e aquosa de 1:6, 2:3 e 2:1.

#### 4.3.2.2 Microextração em fase sólida e Cromatografia gasosa

Com a técnica de cromatografia gasosa e amostragem por microextração em fase sólida foi possível detectar quais compostos estão presentes na fase aquosa, provenientes da migração dos componentes da fase óleo e de

metabólitos produzidos pelo fungo (Tabelas 4 e 5). Serão apresentados os resultados dos tratamentos de B10 e B100 a partir dos tempos 20 e 30 dias, pois foram as amostras com menores valores de pH. Os principais compostos identificados na fase aquosa foram álcoois, ésteres, ácidos, sulfurados, cetonas e fenóis. Estes são produtos da degradação do biodiesel e diesel ou metabólitos produzidos.

Tabela 4. Compostos presentes na fase aquosa em contato com **B10** aos 20 e 30 dias nas proporções 1:6, 2:3 e 2:1 e seus respectivos controles.

<b>Amostra</b>	<b>Compostos</b>
<b>T20 1:6</b>	<b>Fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-metilpropil); 2,4-dimetil; Geraniol; Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); Benzaldeído</b>
<b>T30 2:3</b>	<b>3,5-dimetil benzaldeído; 2,2'-Azobis(2-metipropionitrile); Geraniol; 2-metil-3-fenil-oxirano; Ácido nonanóico; Ácido dodecanóico; Ácido pentadecanóico; Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil)</b>
<b>T30 2:1</b>	<b>1,2,3,7-Tetrametilindol; 3,4-dimetil benzaldeído; Ácido acético, 2-(3-indoliltio); Ácido propanoico; 2-metil-3-fenil-oxirano; Benzeno, 1-metil-2-(2-propenil); Tetralina; Ácido propanóico, Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil)</b>
<b>Controle</b>	
<b>T20 1:6</b>	<b>2-metil-3-fenil-oxirano; Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); Benzaldeído, 2,4-dimetil</b>
<b>T30 2:3</b>	<b>Ácido pentanóico, 2,2,4-trimetil-3-carboxisopropil, isobutl ester; 2-Hidroxietil propil sulfeto; Ácido propanóico, 2-metil-, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil ester; Ácido dodecanóico; Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil)</b>
<b>T30 2:1</b>	<b>1,3,5-Trioxano; Dietil eter, 2,2'-bis(etilio); Hidroquinona, 2,5-di-tert-butil; 1,3,5-Trimetilbenzeno; 3,7-Dimetil-3-octanol; Éter caprílico; Dinonil sebacato; Sulfeto de benzila; 3-metil-1-butanol; Ácido propanóico, 2-metil-, 2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metiletil) propil ester; Ácido propanóico 2-metil-, 3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentil ester; Benzeno, 1-metil-2-(2-propenil); Tetralina; 2-metil-3-fenil-oxirano; Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); Ácido propanóico</b>

**Negrito:** compostos presentes na condição de tratamento. T20: 20 dias. T 30: 30 dias.

Tabela 5. Compostos presentes na fase aquosa em contato com **B100** aos 30 dias nas proporções 1:6, 2:3 e 2:1 e seus respectivos controles

<b>Amostra</b>	<b>Compostos</b>
<b>T30 1:6</b>	<b>2-metil-3-fenil-oxirano; Benzaldeído, 2,4-dimetil; 3-metil-1-butanol; Dinonil sebacato;</b> Fenol, 2,4-bis (1,1-dimetiletil); Ácido propanóico; 1-Decanol, 2-etil; Éter caprílico
<b>T30 2:3</b>	<b>1-Hexano, 3,5,5-trimetil-; Ciclohexanol, 2-(1,1-dimetiletil); Ácido ftálico, diisobutil ester; 7a-Isopropenil-4,5-dimetiloctahidroindeno-4-il metanol; 1-Hexanotiol;</b> Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); Ácido acético, 1,7,7-trimetil-biciclo[2.2.1]hept-2-il ester; 2-Octil salicilato; Ácido decanóico; Ácido propanóico; Éter caprílico; 3-metil-1-butanol; Tiofeno
<b>T30 2:1</b>	<b>p-tert-Butil-.alfa.-metil hidrocinaldeído; Etil ciclohexil cetona; 1-Decanol, 2-etil; Hexanotiol; Tiofeno; 3-metil-1-butanol; Ácido nonanóico;</b> tert-Butyl-p-Benzoquinona; Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); Ácido propanóico; Fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-metilpropil); Ácido decanóico
<b>Controles</b>	
<b>T30 1:6</b>	<b>1,3,5-Trioxano; Tiofeno; Ácido propanóico, 2-metil-, anidrido; Isozonarol; 2-Octil salicilato; Salicilato de homomentila; 3-metil-1-butanol; Ácido decanóico;</b> 1-Decanol, 2-etil; Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); Ácido propanóico; Éter caprílico
<b>T30 2:3</b>	<b>3,7-Dimetil-3-octanol; 4-tert-Butil ciclohexil acetato; Isozonarol; 2-Etil-1-hexanol; 2-Octanol, 8,8-dimetoxi; Fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-metilpropil); Hexanotiol; 3,7-Dimetil-3-octanol; tert-Butil-p-Benzoquinona; Salicilato de homomentila; Ácido nonanóico;</b> Ácido acético, 1,7,7-trimetil-biciclo[2.2.1]hept-2-il ester; Ácido propanóico; Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); Éter caprílico; 2-Octil salicilato; 3-metil-1-butanol; Ácido decanóico; Tiofeno
<b>T30 2:1</b>	<b>1-hexanol, 2-etil; 3,7-Dimetil-3-octanol; 2-Octanol, 8,8-dimetoxi;</b> Fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-metilpropil); tert-Butyl-p-Benzoquinona; Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); Ácido propanóico; Ácido decanóico

**Negrito:** compostos presentes na condição de tratamento. T 30: 30 dias.

As amostras selecionadas para as análises cromatográficas apresentaram menores valores de pH com o intuito de detectar metabólitos ácidos na fase aquosa. A maioria dos compostos presentes podem ser produtos de degradação do combustível, como ácido nonanóico, pentanóico, propanóico e etil ciclohexil

cetona. Alguns são metabólitos da rota de biossíntese de ácidos graxos como ácido decanóico (De Azambuja, 2016). Outros compostos são provenientes da composição original do diesel ou biodiesel como 3,5-dimetil benzaldeído, 2-metil-3-fenil-oxirano, 1-Hexano, 3,5,5-trimetil e ciclohexanol, 2-(1,1-dimetiletil) ou da própria matéria-prima do biodiesel como geraniol e salicilato de homomentila. Alguns aditivos, como antioxidantes ou surfactantes, também foram detectados, hidroquinona, isozonarol, benzoquinona e 1-ecanol, 2-etil.

Os compostos presentes nas amostras controle e que não apareceram nos tratamentos, podem ter sido consumidos. Em contrapartida, outros se mostraram presentes em ambas as condições, indicando que são produtos de degradação abiótica que não foram consumidos e se preservaram até o final do experimento. O ácido propanóico e o fenol, 2,4-bis (1,1-dimetiletil) são compostos representativos deste grupo.

#### 4.3.2.3 Condutividade

Os resultados de condutividade estão relacionados ao consumo de sais presentes no meio mineral Bushnell-Haas utilizado como aporte de nutriente para o fungo filamentosos. As medidas do tempo amostral referentes aos 20 dias de experimento comparadas com as medidas dos 30 e 45 dias mostraram um comportamento atípico do microrganismo. No tempo final não houve diferença entre os valores do tempo inicial de  $3,86 \text{ mS cm}^{-1}$  em todos os tratamentos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6).

Os tratamentos envolvendo B0 e B100 não diferenciaram significativamente dos seus respectivos controles. O tratamento com B10 mostrou diferença ( $P < 0,05$ ) comparado aos controles ao longo dos 45 dias, indicando que houve consumo dos sais da fase aquosa em todas as proporções óleo-água. Comparando-se as médias de todos os tempos amostrais, os tratamentos com B10 diferiram dos tratamentos B0 e B100 com valores de condutividade de  $2,90 \text{ mS cm}^{-1}$ ,  $3,35 \text{ mS cm}^{-1}$  e  $3,17 \text{ mS cm}^{-1}$ , respectivamente.

Tabela 6. Valores das medidas de condutividade ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) dos tempos 0, 10, 20, 30 e 45 dias de incubação com combustíveis B0, B10 e B100 nas proporções de fase oleosa e aquosa de 1:6, 2:1 e 2:3. Valores iniciais do meio mínimo mineral:  $3,86 \text{ mS cm}^{-1}$ .

<b>Combustível B0</b>				<b>Controles</b>				
<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	Sem combustível
<b>0</b>	$3,86 \pm 0,0^*$	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$	<b>0</b>	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$
<b>10</b>	$3,69 \pm 0,07$	$3,72 \pm 0,04$	$3,65 \pm 0,03$	<b>10</b>	$3,78 \pm 0,04$	$3,79 \pm 0,02$	$3,77 \pm 0,02$	$3,81 \pm 0,05$
<b>20</b>	$2,56 \pm 0,18$	$2,85 \pm 0,10$	$2,34 \pm 0,17$	<b>20</b>	$2,57 \pm 0,33$	$2,56 \pm 0,18$	$2,54 \pm 0,35$	$2,92 \pm 0,82$
<b>30</b>	$4,30 \pm 1,38$	$3,19 \pm 0,18$	$2,83 \pm 0,27$	<b>30</b>	$3,28 \pm 0,28$	$2,25 \pm 0,05$	$2,57 \pm 0,65$	$3,96 \pm 0,04$
<b>45</b>	$3,69 \pm 0,36$	$3,66 \pm 0,24$	$3,75 \pm 0,08$	<b>45</b>	$3,52 \pm 0,17$	$3,85 \pm 0,08$	$3,84 \pm 0,03$	$3,96 \pm 0,02$

<b>Combustível B10</b>				<b>Controles</b>				
<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	Sem combustível
<b>0</b>	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$	<b>0</b>	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$
<b>10</b>	$3,31 \pm 0,20$	$3,76 \pm 0,64$	$3,53 \pm 0,12$	<b>10</b>	$3,62 \pm 0,1$	$3,67 \pm 0,16$	$3,58 \pm 0,27$	$3,81 \pm 0,05$
<b>20</b>	$2,35 \pm 0,15$	$2,57 \pm 0,19$	$2,43 \pm 0,30$	<b>20</b>	$2,54 \pm 0,66$	$2,48 \pm 0,26$	$2,43 \pm 0,17$	$2,92 \pm 0,82$
<b>30</b>	$2,78 \pm 0,33$	$2,57 \pm 0,44$	$2,73 \pm 0,40$	<b>30</b>	$3,88 \pm 0,03$	$3,41 \pm 0,26$	$3,58 \pm 0,23$	$3,96 \pm 0,04$
<b>45</b>	$2,87 \pm 0,58$	$3,33 \pm 0,34$	$3,45 \pm 0,28$	<b>45</b>	$3,89 \pm 0,07$	$3,67 \pm 0,17$	$3,45 \pm 0,35$	$3,96 \pm 0,02$

<b>Combustível B100</b>				<b>Controles</b>				
<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	Sem combustível
<b>0</b>	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$	<b>0</b>	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$	$3,86 \pm 0,0$
<b>10</b>	$3,37 \pm 0,09$	$3,62 \pm 0,10$	$3,71 \pm 0,39$	<b>10</b>	$3,56 \pm 0,44$	$3,63 \pm 0,13$	$3,68 \pm 0,09$	$3,81 \pm 0,05$
<b>20</b>	$2,23 \pm 0,18$	$2,40 \pm 0,24$	$2,52 \pm 0,07$	<b>20</b>	$2,58 \pm 0,34$	$2,95 \pm 0,73$	$2,51 \pm 0,30$	$2,92 \pm 0,82$
<b>30</b>	$3,25 \pm 0,21$	$3,42 \pm 0,15$	$3,43 \pm 0,40$	<b>30</b>	$2,89 \pm 0,22$	$3,33 \pm 0,60$	$3,39 \pm 0,44$	$3,96 \pm 0,40$
<b>45</b>	$3,26 \pm 0,54$	$3,31 \pm 0,31$	$3,56 \pm 0,11$	<b>45</b>	$3,89 \pm 0,08$	$3,75 \pm 0,13$	$3,89 \pm 0,05$	$3,96 \pm 0,02$

\*Os dados estão expressados em média  $\pm$  DP. O valor-p foi obtido por ANOVA e teste de Duncan

#### 4.3.2.4 Tensão superficial

Acompanhando as medidas de tensão superficial da fase aquosa na presença de B0, B10 e B100 ao longo dos 45 dias de experimento, foi observada a queda desses valores em relação ao tempo inicial ( $68,47 \text{ mN m}^{-1}$ ) (Tabela 7). Os valores diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ), sendo constatado que a média das medidas de tensão superficial com combustível B100 reduziu de  $68,47 \text{ mN m}^{-1}$  para  $44,95 \text{ mN m}^{-1}$ , com B10 para  $48,59 \text{ mN m}^{-1}$  e com B0 para  $54,91 \text{ mN m}^{-1}$  ao longo dos 45 dias. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com as diferentes proporções nos 45 dias de crescimento fúngico.

Não houve diferença significativa entre o tratamento B100, controle B10 e controle B100. Houve semelhança entre o tratamento B0 e o controle sem combustível, e este entre o controle B0. O único caso em que o tratamento diferiu significativamente do controle foi o de fase aquosa em contato com B10, indicando valores de  $48,59 \text{ mN m}^{-1}$  para o tratamento e  $44,05 \text{ mN m}^{-1}$  para o controle quando se comparam por análise de variância das médias ao longo dos 45 dias.

Nota-se que no tempo final, a fase aquosa em contato com B100 foi a que apresentou a maior redução de tensão superficial observando-se a medição de  $43,70 \text{ mN m}^{-1}$ . No caso do B10 a redução observada foi de  $46,28 \text{ mN m}^{-1}$  e de B0 para  $54,30 \text{ mN m}^{-1}$ .

Tabela 7. Valores das medidas de tensão superficial ( $\text{mN m}^{-1}$ ) dos tempos 0, 10, 20, 30 e 45 dias de incubação com combustíveis **B0, B10 e B100** nas proporções de fase oleosa e aquosa de 1:6, 2:1 e 2:3. Valores iniciais do meio mínimo mineral:  $68,47 \text{ mN m}^{-1}$

<b>Combustível B0</b>				<b>Controles</b>				
<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	Sem combust.
<b>0</b>	$68,47 \pm 0,00$ *	$68,47 \pm 0,00$	$68,47 \pm 0,00$	<b>0</b>	$68,47 \pm 0,00$	$68,47 \pm 0,00$	$68,47 \pm 0,00$	$68,47 \pm 0,00$
<b>10</b>	$53,16 \pm 3,97$	$53,13 \pm 1,95$	$52,21 \pm 1,83$	<b>10</b>	$51,99 \pm 1,53$	$51,06 \pm 7,54$	$51,7 \pm 4,82$	$56,64 \pm 3,85$
<b>20</b>	$67,29 \pm 1,94$	$57,70 \pm 3,58$	$52,21 \pm 2,32$	<b>20</b>	$55,51 \pm 1,58$	$58,05 \pm 3,46$	$56,36 \pm 1,32$	$52,18 \pm 2,00$
<b>30</b>	$50,54 \pm 0,69$	$52,73 \pm 1,21$	$52,67 \pm 1,49$	<b>30</b>	$48,00 \pm 0,18$	$48,29 \pm 0,37$	$52,27 \pm 0,66$	$52,18 \pm 2,00$
<b>45</b>	$53,32 \pm 5,47$	$55,76 \pm 0,45$	$54,07 \pm 1,88$	<b>45</b>	$55,78 \pm 0,87$	$54,19 \pm 0,16$	$53,34 \pm 1,09$	$49,36 \pm 1,74$

<b>Combustível B10</b>				<b>Controles</b>				
<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	Sem combust.
<b>0</b>	$68,47 \pm 0,00$	$68,47 \pm 0,00$	$68,47 \pm 0,00$	<b>0</b>	$68,47 \pm 0,00$	$68,47 \pm 0,00$	$68,47 \pm 0,00$	$68,47 \pm 0,00$
<b>10</b>	$52,04 \pm 4,25$	$47,67 \pm 3,70$	$44,95 \pm 1,08$	<b>10</b>	$46,03 \pm 1,14$	$43,06 \pm 2,76$	$40,93 \pm 1,82$	$56,4 \pm 3,85$
<b>20</b>	$55,31 \pm 0,74$	$51,97 \pm 1,73$	$49,96 \pm 2,64$	<b>20</b>	$46,12 \pm 1,04$	$44,62 \pm 1,42$	$45,47 \pm 1,81$	$52,18 \pm 2,00$
<b>30</b>	$47,94 \pm 1,36$	$50,27 \pm 1,40$	$47,82 \pm 1,38$	<b>30</b>	$46,53 \pm 0,80$	$44,71 \pm 2,14$	$41,69 \pm 1,34$	$52,18 \pm 2,00$
<b>45</b>	$42,65 \pm 1,97$	$48,38 \pm 2,09$	$49,34 \pm 3,47$	<b>45</b>	$45,27 \pm 1,20$	$40,94 \pm 0,70$	$45,38 \pm 1,27$	$49,36 \pm 1,74$

Continuação

<b>Combustível B100</b>				<b>Controles</b>				
<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	<b>Tempo</b>	1:6	2:3	2:1	Sem combust.
<b>0</b>	68,47 ± 0	68,47 ± 0	68,47 ± 0	<b>0</b>	68,47 ± 0	68,47 ± 0	68,47 ± 0	68,47 ± 0
<b>10</b>	45,01 ± 0,87	44,57 ± 1,38	43,79 ± 0,97	<b>10</b>	42,84 ± 0,23	43,09 ± 0,49	42,64 ± 0,91	56,4 ± 3,85
<b>20</b>	45,51 ± 0,85	44,68 ± 1,44	45,41 ± 2,98	<b>20</b>	43,38 ± 1,87	41,21 ± 0,93	42,38 ± 1,25	52,18 ± 2,00
<b>30</b>	45,33 ± 1,15	47,1 ± 0,79	46,89 ± 0,22	<b>30</b>	48,01 ± 0,17	49,78 ± 2,31	51,97 ± 0,75	52,00 ± 2,00
<b>45</b>	42,76 ± 2,46	44,87 ± 2,70	43,49 ± 0,83	<b>45</b>	38,74 ± 2,5	47,78 ± 0,05	41,99 ± 1,11	49,36 ± 1,74

\*Os dados estão expressados em média ± DP. O valor-p foi obtido por ANOVA e teste de Duncan. Sem combust. = Sem combustível

#### 4.3.2.5 Índice de emulsificação

Não foi observada a formação de camada emulsionada da fase oleosa nos tratamentos e controles após 24 horas, que não permitiu calcular o índice de emulsificação. Este resultado sugere que o fungo não foi capaz de produzir bioemulsificante.

#### 4.3.2.6 Produção de lipase

Foi observado resultado positivo de atividade da enzima lipase nas placas contendo agar tributirina pela formação de halo translúcido ao redor do fungo (Gopinath *et al.*, 2005) para os ensaios B10 e B100. Em B0 o fungo não mostrou resultado positivo, pois não produziu enzima capaz de degradar éster de ácido graxo. Com B10 foi positivo nos tempos 20, 30 e 45 em todas as proporções de óleo e fase aquosa. Com B100 foi positivo no tempo 30 e 45 (apenas na proporção 1:6) (Tabela 8). Desta forma o fungo produziu a enzima nestes tempos amostrais.

Tabela 8. Detecção de produção de lipase em ágar tributirina

Tempo de incubação	Combustível	Combustível
	B10	B100
0	-	-
10	-	-
20	+	-
30	+	+
45	+	+

(+) presença de halo translúcido; (-) ausência de halo translúcido

#### 4.3.2.7 Análise por componentes principais

Para melhor visualização da correlação entre diferentes variáveis, foi gerado o PCA (análise de componentes principais). Foram dispostas as variáveis pH, peso seco, tensão superficial e amostras de B0, B10 e B100 nas proporções 1:6, 2:3 e 2:1 apenas do tempo final, aos 45 dias. Segundo o coeficiente de Spearman, as três variáveis, pH, tensão superficial e peso seco, não tiveram correlação (Figura 11).

Analisando apenas os valores de peso seco, notamos que as amostras que apresentaram maior biomassa, são as de B10 e B100 de proporção 1:6 e B100 2:1. As amostras de B0 em todas as proporções e a de B10 2:1, são as de maior

medida de tensão superficial. Em relação ao pH, a amostra que mostrou maior valor foi a de B10 2:3. Desta forma, as amostras de maior peso seco possuem menores medidas de tensão superficial. A variável pH não correlacionou com as variáveis peso seco e tensão superficial, pois as medidas de pH foram similares entre todas amostras.

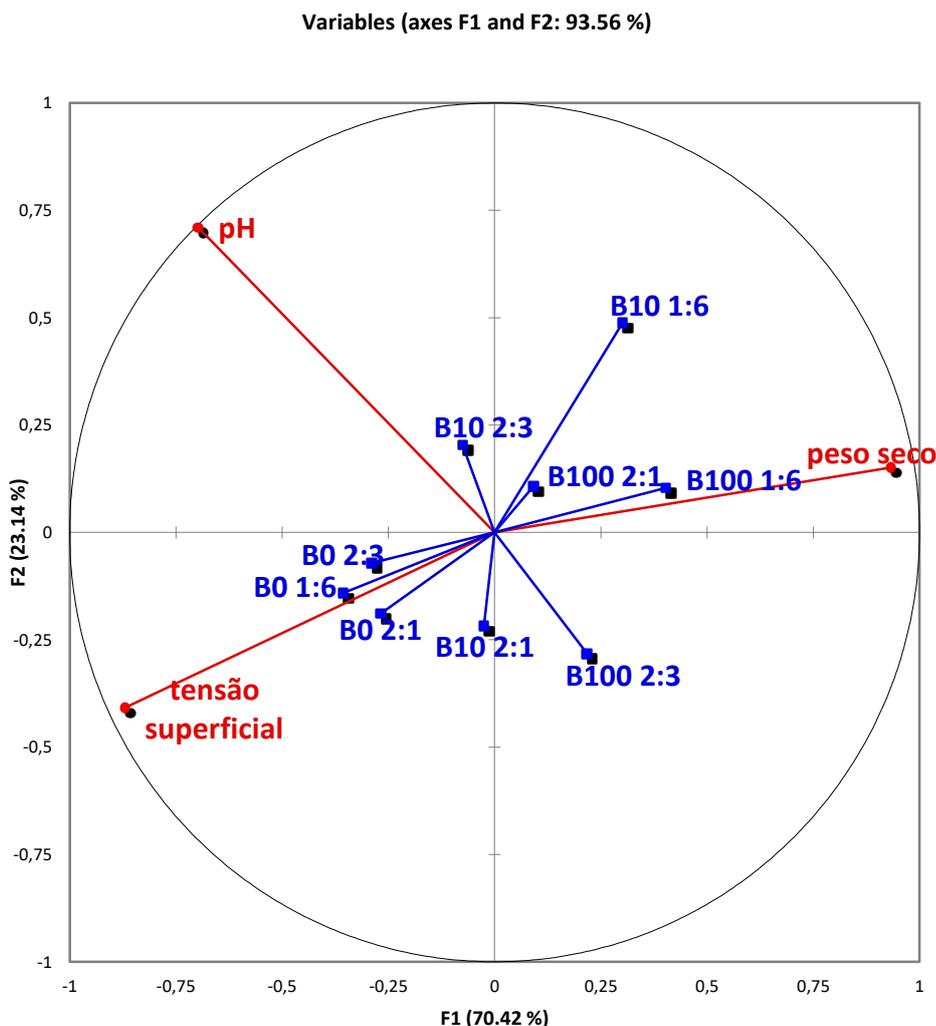


Figura 11. Escores e pesos da análise por componentes principais dos valores de pH, peso seco, tensão superficial e amostras de B0, B10 e B100 nas proporções 1:6, 2:3 e 2:1 aos 45 dias. **Azul: variáveis suplementares.** **Vermelho: variáveis ativas.**

#### 4.3.3 Fase oleosa

##### 4.3.3.1 Análise de espectroscopia de infravermelho

Os resultados da degradação de ésteres do biodiesel puro e da porção de

biodiesel presente na mistura B10 foram obtidos por espectroscopia da região do infravermelho médio. A análise é baseada na observação da função carbonila (C=O) dos ésteres metílicos do biodiesel, que apresenta uma banda única e absorve em região distinta do espectro do diesel.

Analisando a banda aproximadamente da região de  $1750\text{ cm}^{-1}$  referente às vibrações de deformação axial do grupo carbonila, é possível ver uma redução com o tempo e um novo sinal indicativo ao produto da degradação, que surge na região de  $1710\text{ cm}^{-1}$ , nas amostras de B10 e B100, principalmente na proporção de fase oleosa/aquosa de 1:6. Nos espectros de B10, estes picos são mais evidentes (Figuras 12 e 13). Nas amostras de B0, os mesmos espectros não foram gerados na região analisada. Os espectros das amostras controle não apresentaram picos secundários nem diferença entre os tempos amostrais, sugerindo que não foi degradada a região da carbonila do biodiesel.

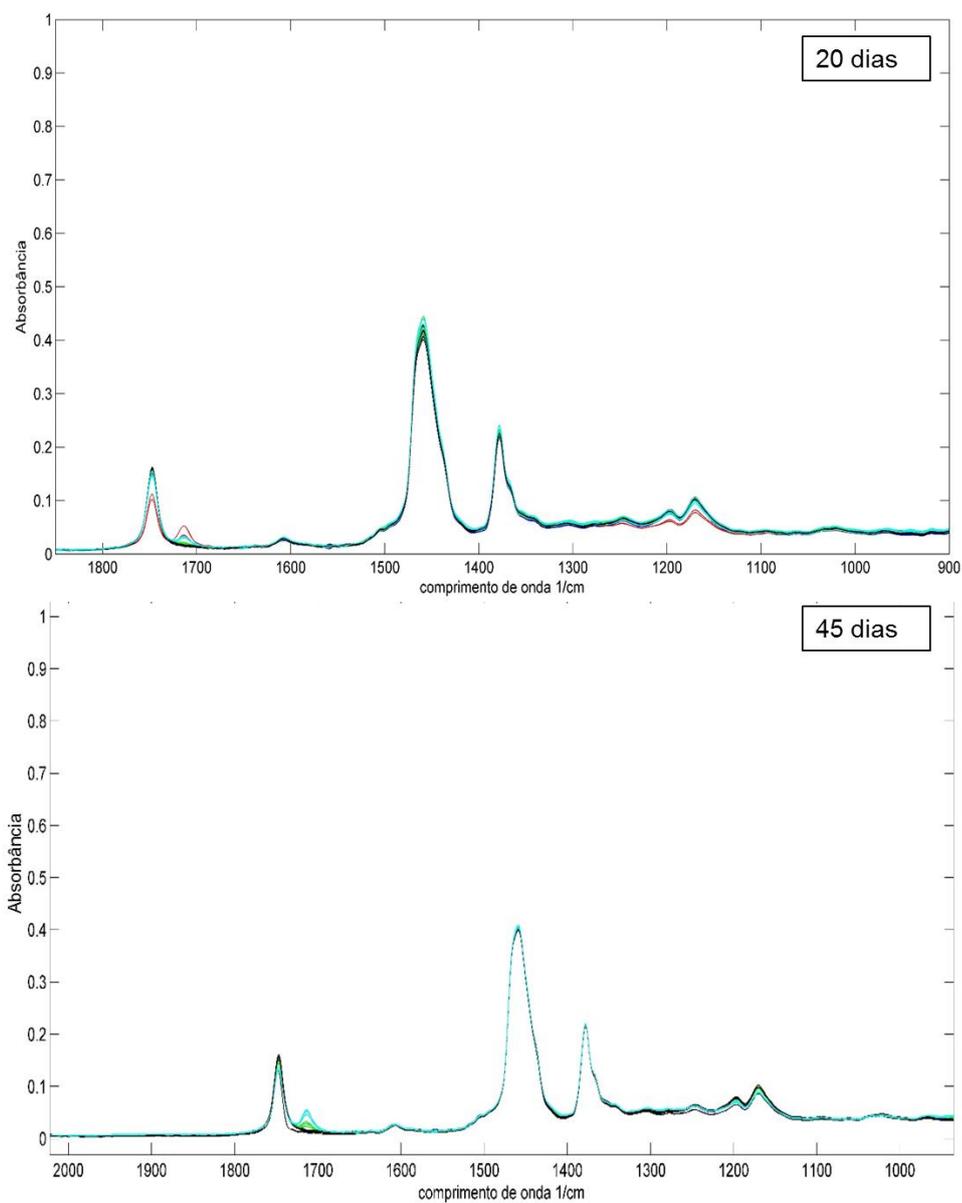


Figura 12. Espectro da região de infravermelho de B10 aos 20 dias e 45 dias. Tempo 0 - azul; Controle - preto; 1:6 - vermelho; 2:1 - verde; 2.3 - ciano

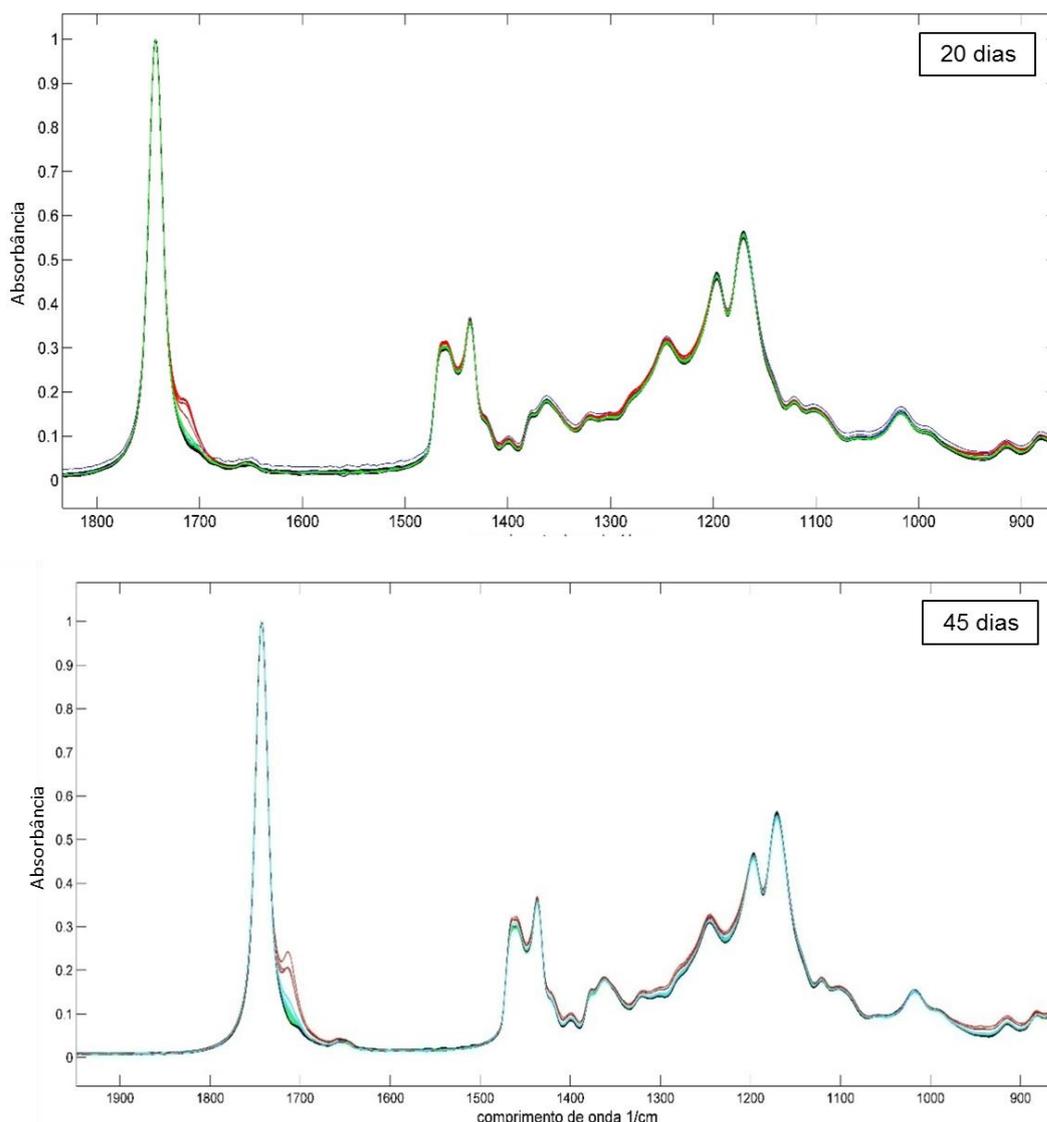


Figura 13. Espectro da região de infravermelho de B100 aos 20 e 45 dias. Tempo 0 - azul; Controle - preto; 1:6 - vermelho; 2:1 - verde; 2:3 - ciano

Com os valores de absorvância máxima do pico da carbonila e a percentagem de degradação, é possível acompanhar ao longo do tempo experimental o quanto e se o combustível foi degradado. Tais análises demonstraram maior percentagem de degradação em **B10** na menor coluna de óleo (1:6) nos tempos 20 e 45 (34,9% e 48,6%, respectivamente) (Tabela 9). Os maiores valores de degradação para **B100** são de 3,4% e 4,4% nas mesmas condições (Tabela 10).

Tabela 9. Valores de absorvância máxima do pico da carbonila e a percentagem de degradação do combustível B10.

<b>Amostra</b>	<b>Média (Abs. Máx)</b>	<b>% de degradação</b>	<b>Amostra</b>	<b>Média (Abs. Máx)</b>	<b>% de degradação</b>
<b>T0</b>	0,0212		<b>T0</b>	0,0212	
<b>T20-1:6</b>	0,0138	34,9	<b>T45-1:6</b>	0,0109	48,6
<b>T20-1:6 C</b>	0,0210	0,9	<b>T45-1:6 C</b>	0,0216	0,0
<b>T20-2:3</b>	0,0192	9,4	<b>T45-2:3</b>	0,0172	18,9
<b>T20-2:3 C</b>	0,0208	1,9	<b>T45-2:3 C</b>	0,0207	2,4
<b>T20-2:1</b>	0,0200	5,7	<b>T45-2:1</b>	0,0195	8,0
<b>T20-2:1 C</b>	0,0204	3,8	<b>T45-2:1 C</b>	0,0196	7,5

Tabela 10. Valores de absorvância máxima do pico da carbonila e a percentagem de degradação do combustível B100.

<b>Amostra</b>	<b>Média (Abs. Máx)</b>	<b>% de degradação</b>	<b>Amostra</b>	<b>Média (Abs. Máx)</b>	<b>% de degradação</b>
<b>T0</b>	0,0951		<b>T0</b>	0,0951	
<b>T20-1:6</b>	0,0919	3,4	<b>T45-1:6</b>	0,0909	4,4
<b>T20-1:6 C</b>	0,0927	2,5	<b>T45-1:6 C</b>	0,0936	1,6
<b>T20-2:3</b>	0,0940	1,1	<b>T45-2:3</b>	0,0944	0,7
<b>T20-2:3 C</b>	0,0946	0,5	<b>T45-2:3 C</b>	0,0930	2,2
<b>T20-2:1</b>	0,0935	1,7	<b>T45-2:1</b>	0,0950	0,1
<b>T20-2:1 C</b>	0,0954	0,0	<b>T45-2:1 C</b>	0,0929	2,3

O dendrograma da análise do combustível B10, formou dois grupos principais distintos. Um grupo com as amostras do tempo 20 (proporção 1:6) e do tempo 45 (proporções 1:6 e 2:3). Outro grupo foi formado pelas amostras controle, amostras do tempo zero, tempo 20 (proporções 2:3 e 2:1) e tempo 45 (proporção 2:1) (Figura 14). As análises feitas com combustível B100, resultaram na formação de dois grupos mais estabelecidos que os grupos de B10. O primeiro grupo com amostras do

tempo 45 (proporções 1:6) e do tempo 20 (proporção 1:6). O segundo grupo com amostras controle, amostras do tempo zero e amostras restantes (Figura 15).

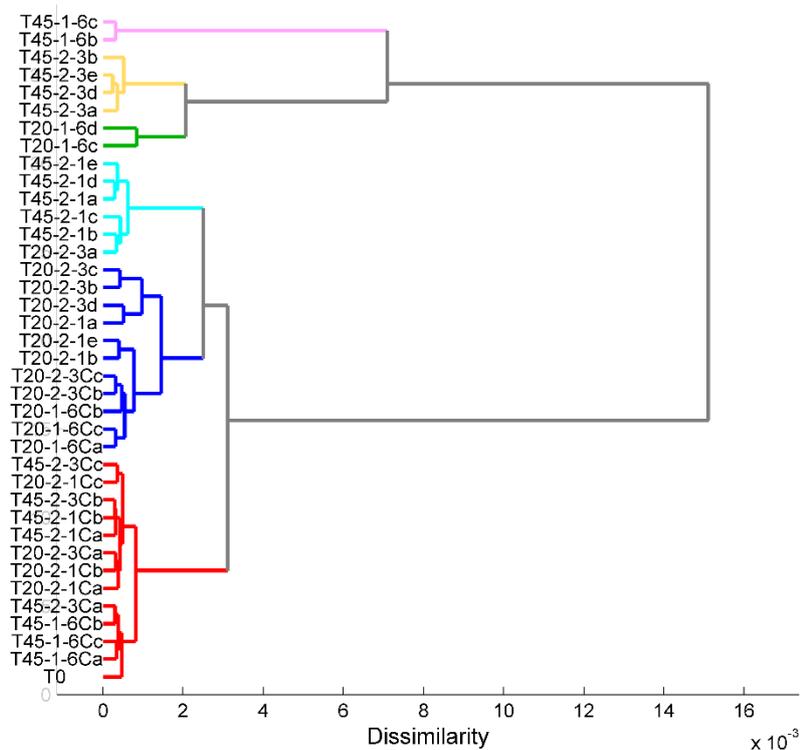


Figura 14. Dendrograma obtido para os dados de infravermelho das amostras de B10. Tempo 45: proporção 1:6 – rosa; proporção 2:3 - amarelo; proporção 2:1 - ciano. Tempo 20: proporção 1:6 – verde; proporção 2:3, controles proporção 1:6 e 2:3 – azul. Tempo 20 e 45: controles proporção 1:6, 2:3 e 2:1. Tempo zero – vermelho.

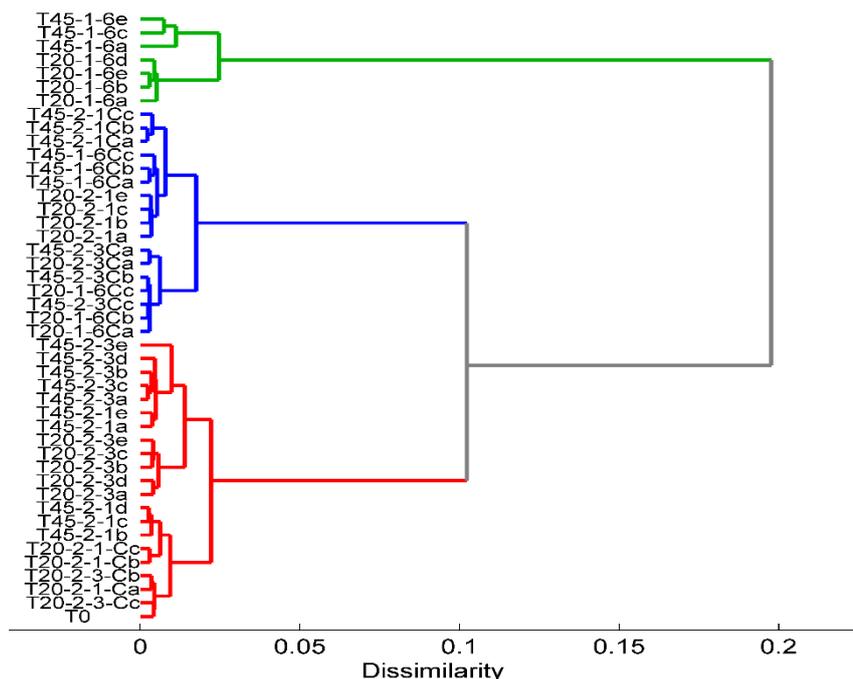


Figura 15. Dendrograma obtido para os dados de infravermelho das amostras de B100. Proporção 1:6 (tempo 20 e 45) – verde; proporção 2:1, controles proporção 1:6, 2:3 e 2:1 – azul; tempo zero, proporção 2:3 e 2:1 (tempo 20 e 45), controles proporção 2:1 e 2:3 (tempo 20) – vermelho.

Pela análise de componentes principais (PCA) das amostras de B10, podemos observar que amostras do tempo 20 da proporção 1:6 foram agrupadas e as das proporções 2:3 e 2:1 deste mesmo tempo amostral foram separadas em outro grupo. As amostras do tempo de 45 dias da proporção 2:3 agruparam-se entre si. Todas amostras controle e amostras do tempo inicial distanciaram-se das amostras dos tratamentos indicando que estas não sofreram degradação significativa (Figura 16). O gráfico de pesos para a componente principal 1 gerado a partir do PCA dos dados espectrais, nos indica que nas amostras agrupadas com escores positivos, o pico da carbonila dos ésteres do biodiesel diminuiu, enquanto que o do produto de degradação aumenta (Figura 17).

No PCA gerado para as amostras de B100, pode-se observar que as amostras da proporção 1:6 dos tempos 20 e 45 distanciaram-se de todas as outras amostras, inclusive controles e tempo inicial (Figura 18). O gráfico de pesos da primeira componente principal, assemelha-se ao de B10, porém indica que a

separação deve-se a carbonila do produto de degradação mostrando um pico único na banda de  $1750\text{ cm}^{-1}$  (Figura 19).

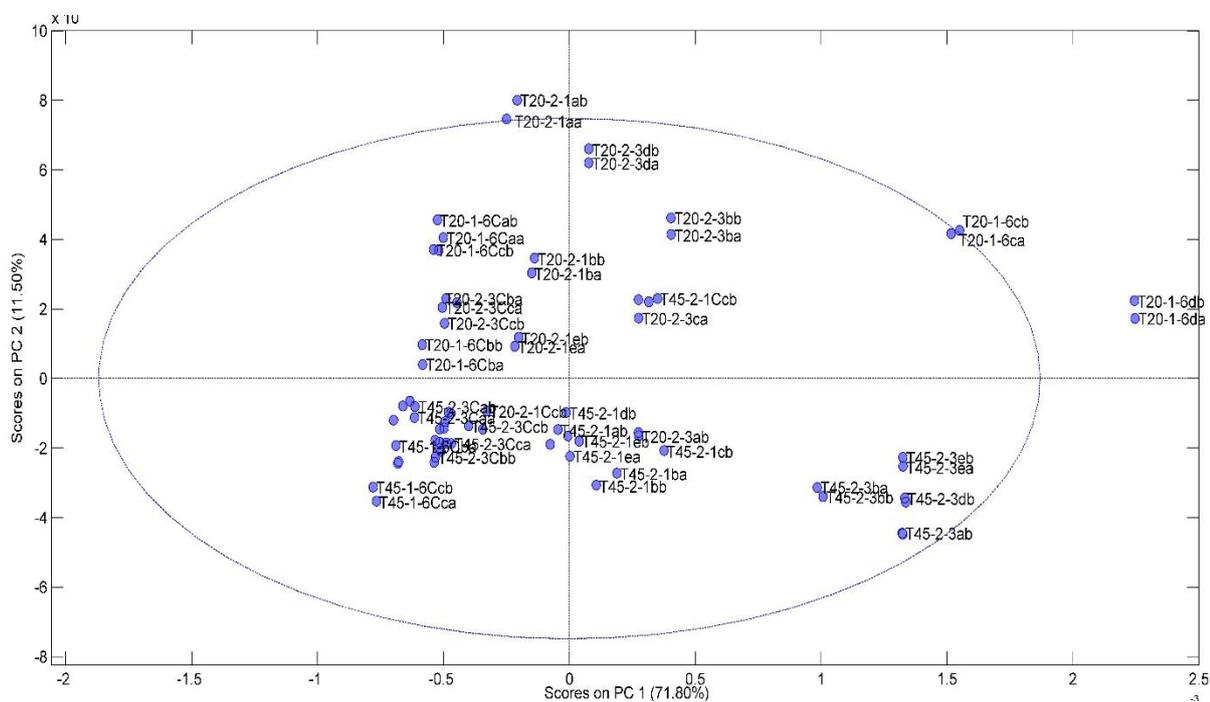


Figura 16. Escores de PCA das análises de B10.

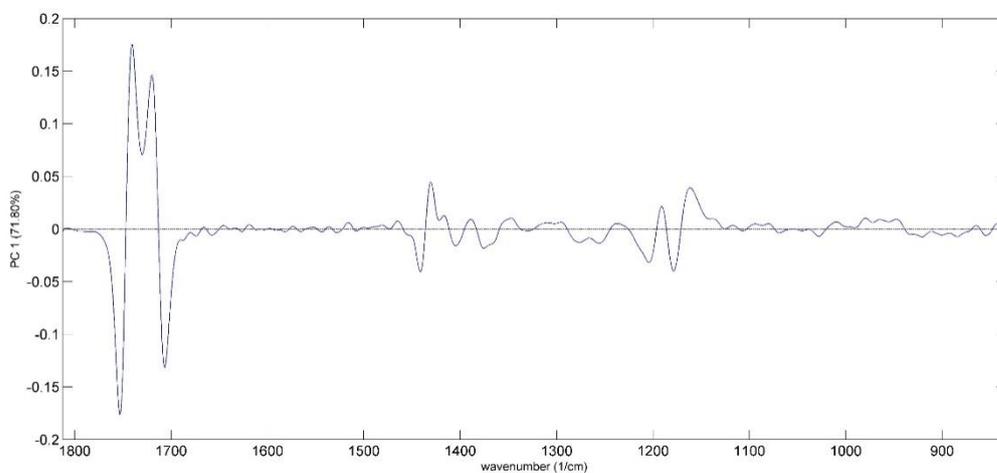


Figura 17. Gráfico de pesos para a primeira componente principal obtido pela PCA dos dados espectrais das amostras de B10.

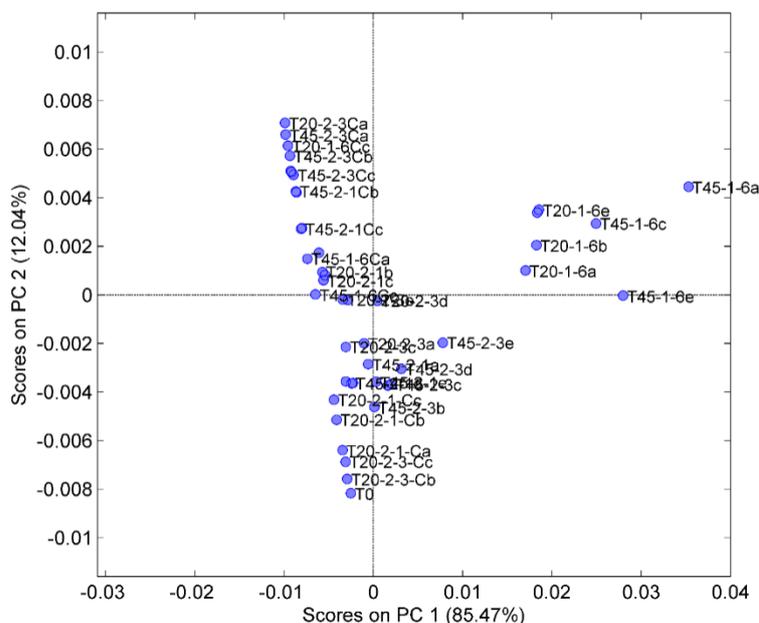


Figura 18. Escores de PCA das análises de B100.

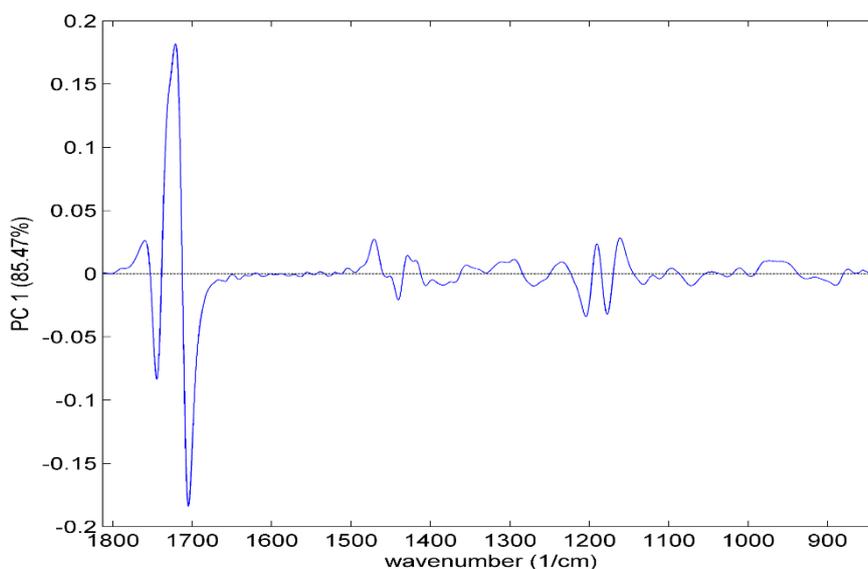


Figura 19. Gráfico de pesos para a primeira componente principal obtido pela PCA dos dados espectrais das amostras de B100.

#### 4.3.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear $H^1$

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é utilizada para determinar a estrutura e identificar o esqueleto carbono-hidrogênio de uma substância orgânica. Desta forma, pelo RMN de  $H^1$ , foi possível determinar quais tipos de prótons estavam presentes nos três combustíveis utilizados para o experimento, através do deslocamento químico aproximado, indicando a degradação de grupos etilênicos,

metilênicos e aromáticos. Na figura 20, podemos comparar os espectros de B0, B10 e B100 no tempo inicial, observando as semelhanças entre os combustíveis puros e a mistura B10.

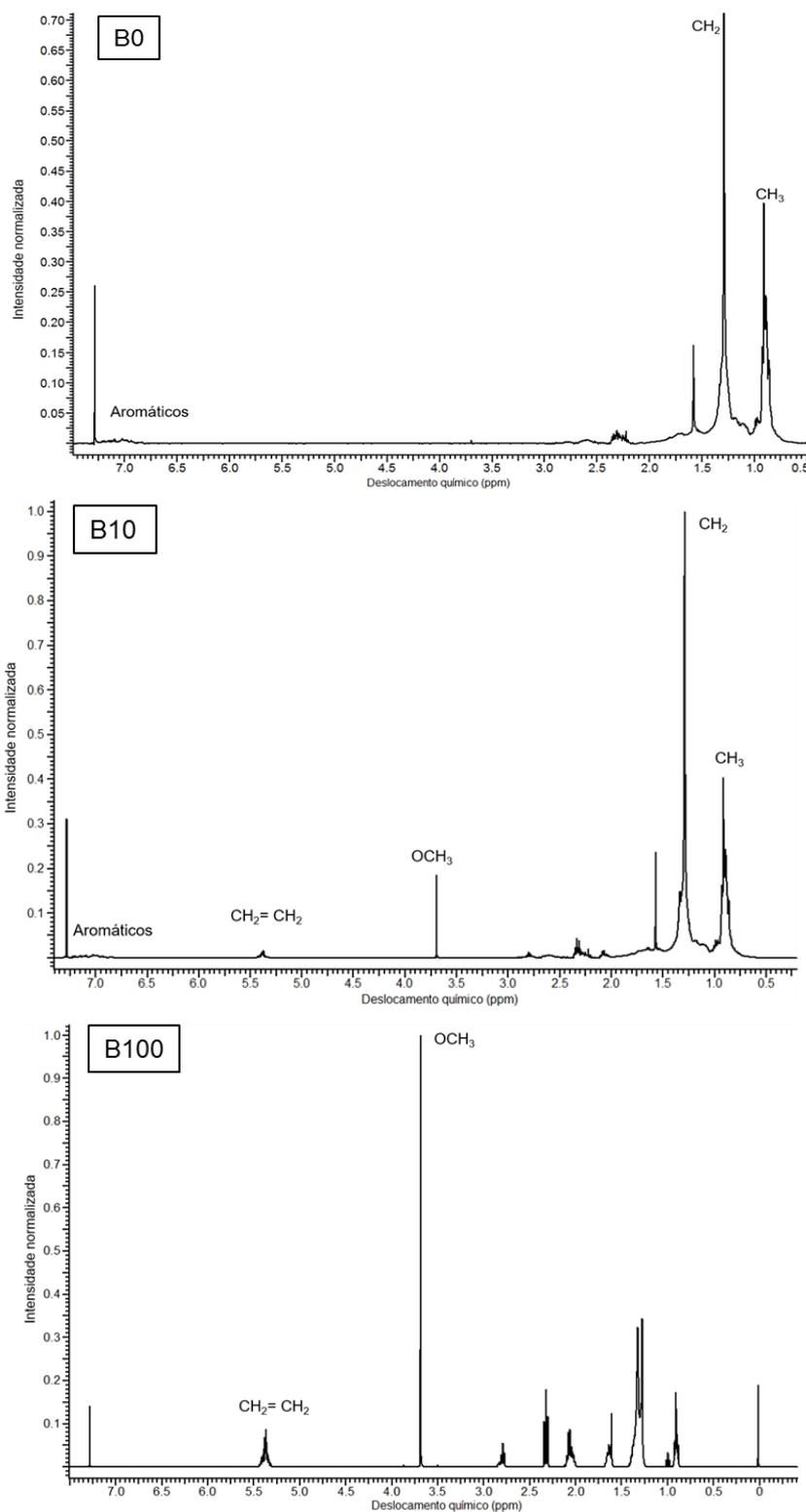


Figura 20. Espectro de RMN- $\text{H}^1$  dos combustíveis no tempo inicial de B0, B10 e B100.

Com os valores demonstrados nas tabelas a seguir (Tabelas 11 e 12), observamos que em B10 os grupos terminais de metilas e de etileno não apresentaram degradação no tempo 20 e apenas 3% no tempo 45. As regiões dos grupos OCH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub> mostraram maior percentual de degradação no tempo 20 de proporção 1:6 que aos 45 dias na proporção 2:1. Nas análises de B100, apenas as regiões OCH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub>-C-C=O apresentaram algum nível de degradação. Em B0, houve uma leve degradação dos compostos metila e etileno e os compostos aromáticos não foram degradados.

Tabela 11. Valores de integração dos sinais de RMN e a percentagem de degradação do combustível B10 nos tempos 0, 20 (proporção 1:6) e 45 dias (proporção 2:1).

Análise	Tempo 0	Tempo 20	% degradação	Tempo 45	% degradação
	Média (Abs. Máx.)	Média (Abs. Máx.)		Média (Abs. Máx.)	
Metila	0,2910	0,3017	0	0,2797	3,9
Etileno	0,4873	0,5054	0	0,4698	3,6
Aromáticos	0,0154	0,0189	0	0,0195	0
OCH <sub>3</sub>	0,0077	0,0050	35,1	0,0072	6,5
CH <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub>	0,0075	0,0057	24,0	0,0075	0

Tabela 12. Valores de integração dos sinais de RMN e a percentagem de degradação do combustível B100 nos tempos 0, 20 (proporção 1:6) e 45 (proporção 1:6) dias.

Análise	Tempo 0	Tempo 20	% degradação	Tempo 45	% degradação
	Média (Abs. Máx.)	Média (Abs. Máx.)		Média (Abs. Máx.)	
CH=CH	0,0814	0,0826	0	0,0835	0
OCH <sub>3</sub>	0,0814	0,0774	4,9	0,0752	7,6
C=C-CH <sub>2</sub> - C=C	0,0358	0,0363	0	0,0368	0
CH <sub>2</sub> -C=O	0,0551	0,0564	0	0,0572	0
CH <sub>2</sub> -C=C	0,0916	0,0932	0	0,0943	0
CH <sub>2</sub> -C-C=O	0,0695	0,0602	13,4	0,0596	14,2
-CH <sub>2</sub>	0,4755	0,4841	0	0,4903	0
CH <sub>3</sub>	0,0764	0,0775	0	0,0789	0

#### 4.3.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear C<sup>13</sup>

Com o objetivo de identificar qual o produto de degradação da porção carbonila do biodiesel, foram analisadas apenas amostras de B100. Comparando o espectro de RMN-C<sup>13</sup> de B100 na proporção 1:6 do tempo inicial com o espectro do tempo final, percebe-se o surgimento de um pico entre 178 e 179 ppm. Este pico é característico de carbono do grupo funcional de ácido carboxílico. Assim, possivelmente este é o produto de degradação dos ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel (Figura 21).

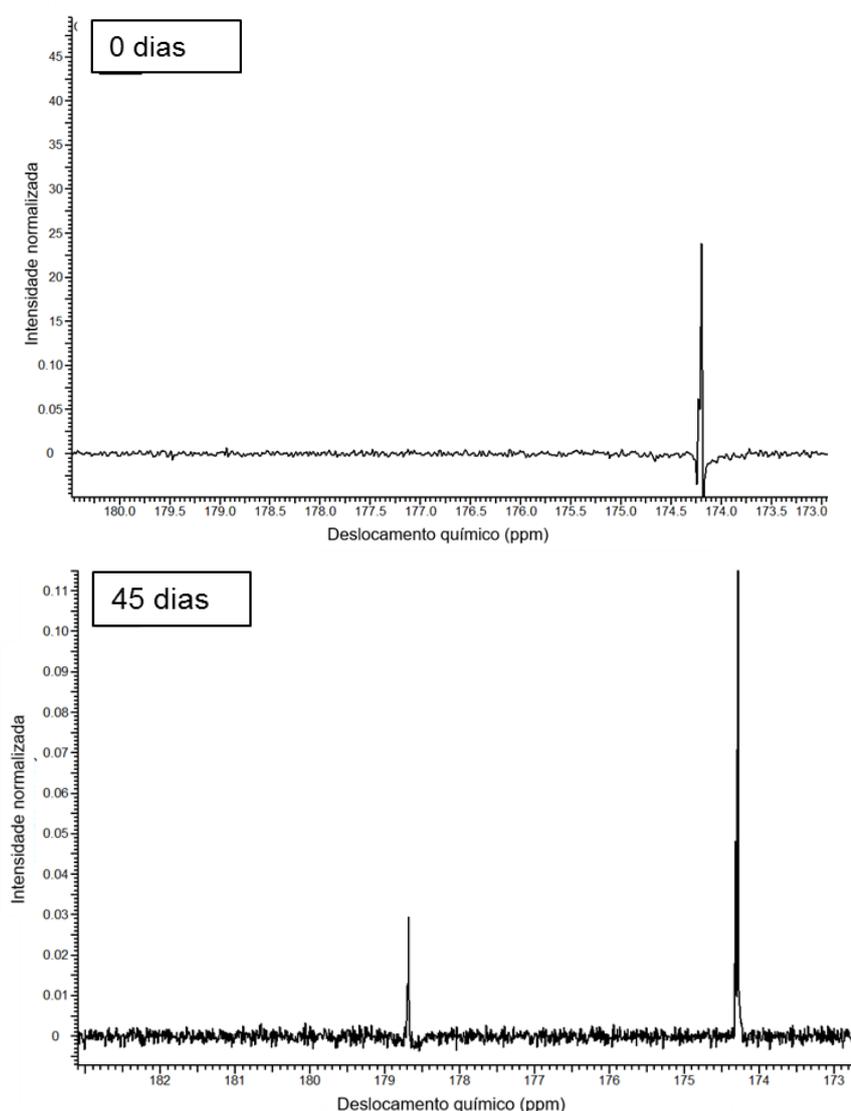


Figura 21. Espectro de RMN-C<sup>13</sup> de B100 nos tempos 0 e 45 dias.

#### 4.3.4 Detecção de genes de degradação

O gene relacionado ao Citocromo P450 está envolvido na degradação de hidrocarbonetos alifáticos, como os alcanos presentes no óleo diesel. Com o intuito de detectar tal gene em *Pseudallescheria boydii*, realizou-se a técnica de PCR. Após esta reação e a visualização do gel de agarose em transluminador, foi detectada a presença do gene nas amostras de DNA do fungo após 7 dias de crescimento em caldo malte (Figura 22). A detecção do gene de carboxilesterase informa sobre a capacidade do fungo em produzir tal enzima, responsável pela degradação dos ésteres de ácido graxo do biodiesel.

Na reação de PCR foi amplificada mais de uma banda de DNA. Dentre estas bandas, observamos o tamanho esperado de 590 pb referente à região da carboxilesterase. Pelo fato de os oligonucleotídeos iniciadores possuírem bases degeneradas, algumas delas podem encontrar homologias inespecíficas em várias regiões do genoma do fungo, gerando diversos fragmentos de DNA após a amplificação (Figura 23).

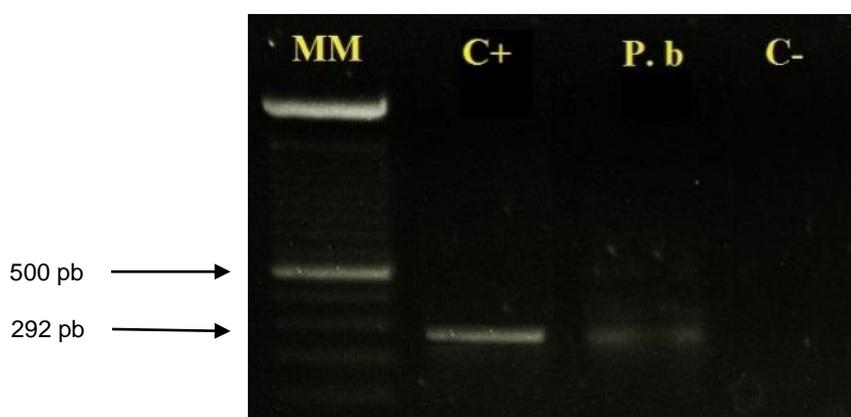


Figura 22. Detecção do gene P450 (292 pb) em *P. boydii* após crescimento em caldo malte. MM: Marcador molecular (100 pb); C+: controle positivo; P. b: *P. boydii*; C-: Controle negativo.

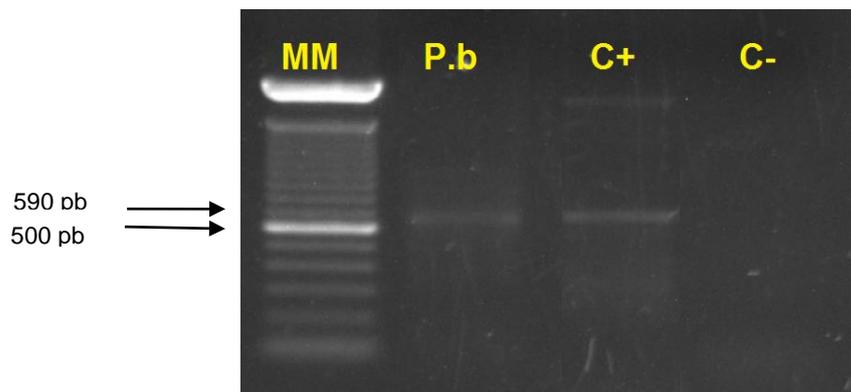


Figura 23. Detecção do gene de carboxilesterase (590 pb) em *P. boydii* após crescimento em caldo malte. MM: Marcador molecular (100 pb); P. b: *P. boydii*; C+: controle positivo; C-: Controle negativo.

## 4.4 DISCUSSÃO

### 4.4.1 Crescimento microbiano

Ao longo dos 45 dias de experimento, foram realizadas medidas de peso seco para quantificação de biomassa formada na interface óleo-meio mineral, com os combustíveis B0, B10 e B100. A produção de biomassa de *Pseudallescheria boydii* acompanhada nos dias 10, 20, 30 e 45 dias, é mostrada na Figura 8. O acompanhamento da biomassa vem sendo utilizado em vários estudos, na determinação do potencial deteriorogênico de microrganismos degradadores em situações de estocagem simulada de diesel e biodiesel (Bento *et al.*, 2004; 2005; Beker, 2014; Bucker *et al.*, 2011, 2015; Cazarolli *et al.*, 2012).

A condição que favoreceu significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento fúngico foi a mistura B10, independente da proporção de fase oleosa/aquosa, sendo observado valor 1,51 vezes maior em relação ao B100 e 4,90 vezes maior ao B0 nos 45 dias do experimento. Existem estudos sobre a facilidade de metabolização de biodiesel puro pelos microrganismos por ser um produto natural constituído por ácidos graxos (Zhang *et al.*, 1998). Alguns estudos compararam a degradação com o diesel puro e com misturas, que é uma mistura de alcanos e compostos aromáticos (Marchal *et al.*, 2003) e que exige enzimas específicas para a degradação, o que pode torná-lo recalcitrante para alguns microrganismos (Johnsen *et al.*, 2005; Kauppi *et al.*, 2011).

O percentual de biocombustível pode ter contribuído para a aceleração da degradação e conseqüentemente, crescimento do micélio (Horel & Schiewer, 2011). Alguns autores como Horel *et al.* (2009), averiguaram que alguns microrganismos se desenvolvem melhor em contato com misturas ou biodiesel puro. Em outras pesquisas desenvolvidas, foram encontrados resultados similares por Schleicher *et al.* (2009), que obtiveram maior crescimento microbiano em B20 e B5 e menor crescimento em B100 em sistemas aerados. Souza *et al.* (2016) observaram semelhança em contagem de Unidades Formadoras de Colônias em B5, B10 e B25, diferindo das contagens em B100 de bactéria isolada do Lago Guaíba, Brasil.

Quanto a influência da coluna de fase oleosa acima da fase aquosa na disponibilidade de oxigênio para o microrganismo, obtivemos resultado significativo observando a média da biomassa das três proporções de fase oleosa/aquosa

isoladamente. A biomassa diferiu significativamente ao longo da curva de crescimento entre a proporção com menor coluna de óleo (1:6) e as demais proporções. Em estocagem simulada, as proporções estipuladas de 5, 20 e 60 mL de combustível para 30 mL de meio BH, de modo geral contribuíram para se avaliar o grau de bloqueio e aeração de um tanque de armazenamento ou durante o transporte por 45 dias. As condições de aerobiose e anaerobiose em tanques de estocagem de óleo foram investigadas por Cai *et al.* (2015). A microbiota do reservatório foi capaz de degradar as frações mais lábeis de óleo em 7 dias, biodegradando aerobiamente alcanos, benzenos e naftalenos. Entretanto, na parte mais profunda do reservatório, não houve biodegradação aeróbia, devido à baixa taxa de oxigênio, estimulando o crescimento de microrganismos anaeróbios.

O uso de meio mineral como aporte de nutrientes mínimos para o desenvolvimento de microrganismos foi descrito em pesquisas por Bento *et al.* (2001; 2005). Esta estratégia se mostrou eficiente em avaliar o crescimento de fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotii* e *Hormoconis resinae* em diesel. Cazarolli (2014) em estudo com *Pseudallescheria boydii* observou que em 60 dias de incubação, o maior valor de biomassa produzido e recuperado da interface óleo-água foi em biodiesel de linhaça (611,6 mg), seguido por biodiesel de soja e oliva (547,6 mg e 532,0 mg), utilizando meio BH como fase aquosa. Bucker *et al.* (2011) demonstraram a capacidade de crescimento de *Aspergillus fumigatus*, *Candida silvicola*, *Paecilomyces* sp. e *Rhodotorula* sp. em blendas B5, B10 e B20 e meio mínimo mineral Richard & Vogel.

Com relação à curva de crescimento de *Pseudallescheria boydii* em B0, até o tempo 10 foi observada a fase log nas proporções 2:3 e 2:1 e até o tempo 20 em 1:6, apresentando declínio/morte celular a partir do tempo 30 em 1:6 e 2:3 e nos primeiros 10 dias em 2:1. Em B10, na proporção 1:6 apresentou-se fase log até o tempo 20 e mostrou-se crescimento até o tempo 45. Em 2:3 e 2:1 foi observado o mesmo comportamento de crescimento até o tempo 30, seguido por fase de declínio. Em B100, em todas as proporções, obtivemos fase log até o tempo 10, seguida de declínio, voltando o crescimento aos 30 dias. Neste combustível, teve como diferença a fase de declínio após o tempo 30 em 1:6 e 2:1 e fase log aos 45 dias em 2:3. Os resultados mostram características distintas entre as condições em que o mesmo microrganismo foi avaliado.

#### 4.4.2 Fase aquosa

*P. boydii* mostrou capacidade de produzir lipase extracelular pela hidrólise da tributirina, um triacilglicerol que forma emulsão opaca no ágar. Essa substância tenso-ativa é facilmente dispersa na água por agitação e sem adição de emulsificante (Gopinath *et al*, 2013). A produção desta enzima contribui para a degradação da porção biodiesel e conseqüente crescimento celular.

Em 2008, Janda-Ulfig já havia testado essa característica de *P. boydii* isolado de lodo de esgoto e de casos clínicos. O fungo cresceu em todos os substratos testados (ágar contendo tributirina, óleo de colza, biodiesel e diesel). Gopinath *et al.* (2005), isolaram fungos de resíduos de usina de óleo. Após filtrar a cultura para remoção de micélios, esta foi colocada em poços do ágar com tributirina. Diversos fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Paecilomyces variotii* mostraram resultado positivo. Neste estudo ainda foram utilizados meios de cultura com Tween-20 e LBT (Luria-Bertani Tributyrin) para detecção de atividade lipolítica. Outros autores utilizaram o meio para detectar a ação lipolítica de microrganismos por *screening* ou os isolando de diferentes ambientes (Godoy *et al.*, 2009; Toscano *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2016).

As medidas de pH da fase aquosa não indicaram redução significativa entre os tratamentos. Em alguns tempos amostrais (20, 30 e 45 dias) foram detectados valores menores, indicando a possível produção de metabólitos ácidos por *Pseudallescheria boydii*. A redução do pH também pode estar associada à lise celular, produtos poliméricos e ácidos orgânicos (Parbey, 1970). Autores como Santos *et al.* (2007) associaram a capacidade do fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* em biotransformar o óleo bruto de dendê e gerar ácidos graxos livres, aumentando sua acidez. Bento *et al.* (2005) observaram o decréscimo de pH 7,0 para 4,8 do meio mineral Bushnell-Haas após 60 dias de cultivo de *Aspergillus fumigatus* sem diesel, além de detectar álcoois, cetonas e ácidos propiônicos por microextração em fase sólida. Soriano *et al.* (2015) compararam a degradação de consórcio microbiano em biodiesel de soja, biodiesel de sebo bovino, diesel e mistura B5 durante 42 dias de armazenamento. Durante este tempo foi observado aumento no número de acidez nos sistemas (maior que o limite de 0,50 mg KOH g<sup>-1</sup>). Com a redução do pH, pode-se sugerir que o aumento na acidez se deve à produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos. Considerando os resultados em que não houve mudança de pH ou

em que esses valores aumentaram, podemos supor a produção de metabólitos básicos ou neutros.

Conforme resultados, o fungo mostrou capacidade de produzir biomassa, porém não foram observadas reduções significativas de pH da fase aquosa. Uma das razões pode ser explicada pela concentração dos fosfatos  $\text{KH}_2\text{PO}_2$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  que compõem o meio mineral Bushnell-Haas e que poderiam exercer efeito tamponante. Para atender a uma necessidade de balanço nutricional (fonte de fósforo) à célula microbiana, os fosfatos sempre devem ser adicionados aos meios de cultura e mínimos. Bento & Gaylarde (2001) testaram tal efeito adicionando concentrações crescentes de HCl 0,1M e NaOH 0,1M a ponto de ser necessário 1 mL de HCl 0,1M em 50 mL de meio Bushnell-Haas para diminuir o pH de 7,2 para 6,4. Em 2009, Bucker observou a redução do meio mínimo mineral de 7,1 para 6,7 com a adição de 0,2 mL de HCl a 1M. Em 2013, Cazarolli *et al.* acompanharam o consumo de fosfato do meio mineral em questão (valor inicial de  $1,23 \text{ g L}^{-1}$ ) pelos fungos *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium aurantiacum* e *Paecilomyces variotii* em contato com biodiesel de soja, oliva e linhaça, mostrando uma possível concentração de fosfato capaz de mascarar as modificações de pH da fase aquosa. Desta forma, apenas a medida de pH, pode não informar sobre a natureza dos metabólitos que dependendo da concentração dos ácidos produzidos, podem não ser detectados ou ainda podem ser mascarados pelos tampões adicionados. O biodiesel ainda possui em sua composição fosfatídeos que podem migrar para a fase aquosa, causando alterações nas concentrações de fosfato do microcosmo (Lôbo *et al.*, 2009).

Os compostos encontrados na fase aquosa pela técnica de cromatografia gasosa podem ser provenientes da migração dos combustíveis pela sua degradação, sendo oriundos da matéria-prima do biodiesel ou do refino do petróleo no diesel. Com a degradação, alguns ácidos carboxílicos foram detectados, provavelmente tornando o pH do meio mínimo mineral mais ácido. Assim, os resultados obtidos por infravermelho nas amostras do experimento, em que foi observada a diminuição do pico da carbonila e o aumento de pico de produto de degradação são reforçados. Desta forma, os hidrocarbonetos ou ácidos graxos dos combustíveis ficaram disponíveis na fase aquosa, sendo provavelmente metabolizados pelo fungo mais facilmente. A amostragem por microextração em fase sólida para subsequente análise por cromatografia gasosa vem sendo utilizada para avaliação da composição ou

degradação relacionada a óleos (Gieg *et al.*, 2010; Aktas *et al.*, 2010, 2013). Callaghan (2013), por exemplo, menciona diferentes técnicas para uso em metabolômica em ambientes impactados com hidrocarbonetos.

As medidas de condutividade mostraram diferença estatística entre o tratamento e controle apenas nos microcosmos contendo B10. A redução da condutividade aos 20 dias do experimento deve-se ao consumo dos sais do meio mineral pelo microrganismo. O esperado seria manter-se a diminuição dos valores de condutividade, reduzindo a quantidade de sais disponíveis no meio aquoso. Apesar de ter sido observada uma oscilação entre os tempos amostrais, no tempo final os valores foram semelhantes ao tempo inicial. Bento & Gaylarde (2001) observaram a maior redução de condutividade da fase aquosa após 60 dias de cultivo com microrganismos deteriogênicos em meio mineral e diesel.

A realização de medidas de tensão superficial teve como intuito detectar compostos surfactantes provenientes do crescimento celular e o índice de emulsificação para verificar a presença de compostos com ação emulsificante. Estas substâncias facilitam o crescimento do microrganismo, pois a redução da tensão superficial torna o substrato mais disponível pela solubilização dos hidrocarbonetos (Singh *et al.*, 2007) e pelo aumento da hidrofobicidade celular (Paria, 2008). Com os resultados semelhantes da redução da tensão superficial tanto nos tratamentos quanto nos controles com B100, supõe-se que estes dados estão associados aos ésteres de ácidos graxos, assemelhando-se à estrutura de alguns surfactantes (Bognolo, 1999). Assim, podem simular a ação dos biosurfactantes produzidos pelos microrganismos.

Ainda, o controle com inóculo e sem combustível foi capaz de mostrar alguma ação surfactante oriunda apenas do fungo. O meio em contato com B10 com e sem inóculo mostrou diferença significativa ( $P < 0,05$ ), indicando que o fungo também influenciou neste caso a alteração da tensão superficial. A maioria dos biosurfactantes são produzidos na presença de substratos hidrofóbicos, mesmo que a produção ocorra em contato com fontes de carbono solúveis em água (Fontes, 2008).

O comportamento dos fungos *Paecylomyces* sp. e *Aspergillus fumigatus* em 60 dias de cultivo no estudo de Bücken *et al.* (2011) indicaram que não ocorreu produção de surfactantes pela redução da tensão superficial da fase aquosa em

contato com B100 de  $53,8 \text{ mN m}^{-1}$  para  $41,0 \text{ mN m}^{-1}$  e  $39,2 \text{ mN m}^{-1}$  e nos controles para  $38,7 \text{ mN m}^{-1}$  e  $40,2 \text{ mN m}^{-1}$ . Cazarolli *et al.* (2014) mostraram resultados semelhantes com *Pseudallescheria boydii* e biodiesel. Nos primeiros 7 dias de experimento a tensão superficial decresceu e se manteve nos 60 dias seguintes nos frascos de tratamento e controle, não mostrando diferença entre eles. Estudos utilizando B5, B10 e B20, relataram a redução da tensão superficial do meio mineral apenas pelo fato de estar em contato com tais combustíveis e pelas características do biodiesel presente nas blendas (Meyer, 2011; Souza, 2012). Os ácidos graxos aumentam a estabilidade de gotas de óleo na água ao diminuir a tensão superficial e reduz a sua re-agregação, promovendo a dispersão da fase oleosa ou estabilidade das emulsões (DeMello *et al.*, 2007).

Os tubos contendo fase aquosa com e sem inóculo, fase oleosa e solução de rosa de bengala para o teste de índice de emulsificação não mostraram camada emulsificada após agitação e 24 horas de repouso. Este resultado indica que o fungo submetido ao experimento não foi capaz de produzir compostos com esta propriedade.

Com a análise de componentes principais (PCA) foi possível visualizar que o pH não teve correlação com o aumento do peso seco no tempo final de experimento. Os resultados de pH não mostraram tendência em aumento ou diminuição dos valores, sendo destacado apenas o maior valor em B10 na proporção 2:3 e menor em B100 na proporção 1:6. Tratando-se de tensão superficial, após 45 dias, principalmente as amostras de B0 não apresentaram muita alteração. Devido à falta de necessidade do fungo em produzir biossurfactante nesta condição ou de não mostrar a característica semelhante à biossurfactantes como acontece com B100. Quanto ao peso seco, a proporção 1:6 propiciou a maior formação de biomassa, como discutido anteriormente.

#### 4.4.3 Fase oleosa

As técnicas utilizadas para determinar a degradação dos ésteres metílicos do biodiesel ao longo do tempo experimental complementaram-se ou confirmaram os resultados obtidos. Os espectros da região de infravermelho demonstraram qual grupo funcional diminuiu seu pico (função carbonila) e o surgimento de picos secundários, sendo produtos desta degradação. Souza (2012) obteve resultados semelhantes em

estudo com *P.aeruginosa* em diferentes percentuais de blenda de biodiesel e diesel. Avaliaram a degradação dos combustíveis pela região da carbonila utilizando a técnica de infravermelho.

Com os valores de percentual de absorbância, foi possível inferir o quanto destes compostos foram provavelmente consumidos pelo fungo filamentoso nos tempos amostrais e em relação às proporções de fase oleosa/aquosa analisados. Nas análises de PCA e HCA, pudemos observar o agrupamento das amostras semelhantes. Os tratamentos que se distanciaram das amostras controle indicam que houve grande mudança na composição dos combustíveis em contato com microrganismo.

As amostras da blenda B10 na proporção de fase oleosa/aquosa de 1:6 do tempo 20 dias mostraram maior degradação. As amostras de B100 apresentaram maior degradação na proporção 1:6 aos 45 dias. A biodegradação dos ésteres de ácidos graxos depende de várias condições para ocorrer, como a composição do biodiesel, temperatura, disponibilidade de oxigênio e potencialidade dos microrganismos em questão (Horel & Schiewer, 2011; Jakeria *et al.*, 2014). Observando a ausência de picos secundários e a semelhança dos espectros em todos tempos amostrais das amostras controle, sem adição de inóculo, sugere-se que não houve degradação abiótica muito evidente.

Na mistura de diesel e biodiesel, os dois combustíveis podem ter sido metabolizados pelo microrganismo em taxas semelhantes por cometabolismo. Com RMN- $H^1$  foi possível detectar os compostos presentes no diesel. O percentual de degradação de metila e etilênicos não mostrou diferença entre o diesel puro e a blenda. O percentual de hidrocarbonetos aromáticos foi considerável em B10. Estes dados sugerem que a interação entre o diesel e 10% de biodiesel na mistura proporcionou adequado aporte de energia para *Pseudallescheria boydii*.

Diversos estudos utilizam espectroscopia de infravermelho RMN para analisar a oxidação, qualidade ou alteração dos biocombustíveis. Chuck *et al.* (2012) compararam várias técnicas, como FTIR (Fourier Transform Infrared) e RMN  $H^1$  e  $C^{13}$  para avaliar a oxidação de biodiesel a 90°C e 150°C. De Azambuja *et al.* (2017) tiveram como base os resultados destas técnicas para comparar a biodegradação de diesel em diferentes teores de enxofre. Furlan *et al.* (2010) utilizaram IFTR para investigar a oxidação de biodiesel de óleo vegetal usado e Mahamuni *et al.* (2009) para

monitorar óleo e biodiesel de soja nas reações de transesterificação. Alguns trabalhos demonstram a determinação e quantificação do teor de biodiesel em misturas de diesel/biodiesel (Castilho-Almeida *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2016). Estes autores inferiram que esta técnica é amplamente aplicável, pois não requer tratamentos prévios e disponibiliza dados rapidamente.

Em relação às análises de RMN  $H^1$ , o combustível B10 apresentou maior percentual de degradação dos compostos aromáticos, comparado ao diesel puro e de  $OCH_3$  comparado ao biodiesel puro. Como proposto anteriormente, o fungo filamentososo desenvolveu-se melhor em B10. Suas enzimas, como monoxigenase e carboxilesterase, provavelmente tiveram maior sucesso em degradar o diesel e biodiesel juntamente na mistura. Desta forma, o microrganismo teve a capacidade de metabolizar os compostos de ambos os combustíveis.

A ressonância magnética nuclear de hidrogênio vem sendo aplicada em outros estudos como na quantificação de metil presente no biodiesel de soja e óleo de mamona em misturas com três tipos diferentes de diesel (Monteiro *et al.*, 2009) e na quantificação do biodiesel em diesel de petróleo (Portela *et al.*, 2016). Ainda, é utilizada para discriminar a matéria-prima utilizada no biodiesel ou na avaliação de sua qualidade (Flores *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2012). De Azambuja (2016) utilizou RMN  $H^1$  para comparar a biodegradação de B0 e B10 com diferentes teores de enxofre. Foi verificada uma tendência de degradação em todos os tratamentos e em especial na mistura B10 S500.

Em RMN  $C^{13}$ , o pico aparente indica o surgimento de ácido carboxílico como produto de degradação correspondente ao pico no espectro de infravermelho na região de  $1710\text{ cm}^{-1}$ , não sendo consumido pelo fungo em sua rota metabólica. Essa ferramenta também é aplicada para outros fins, como verificar a pureza do combustível (Kumar, *et al.*, 2016) ou a síntese do biodiesel pela conversão de triglicerídeos em metil ésteres (Tariq *et al.*, 2011).

#### 4.4.4 Detecção de genes

Diversas técnicas são usadas para o estudo de fungos deteriorogênicos. Entre elas está o sequenciamento de alto rendimento para identificação de fungos (De Azambuja *et al.*, 2017); PCR quantitativo para determinar curva de crescimento com base em genes específicos para fungos, leveduras e arqueas ou demais genes

(Lutterbach *et al.*, 2014; Bücken *et al.*, 2015); e PCR convencional com o objetivo de detectar genes de interesse (Souza, 2012).

Em relação a genes de degradação de alcanos, destacamos os CYPs que codificam para as monoxigenases do Citocromo P450. Os estudos desta enzima em microrganismos datam da década de 1986 (Käppeli) e as pesquisas referentes à sua função em fungos ainda são insuficientes. Os dados sobre lipase envolvidas na biodegradação de biocombustíveis ainda são muito variados. Muitos estudos abordam para o uso da lipase na produção de biodiesel ou para o crescimento microbiano em óleos e gorduras (de Castro *et al.*, 2004; Nguyen *et al.* 2010; Singh & Mukhopadhyay, 2012; Gopinath *et al.*, 2013; Poli *et al.*, 2014).

Desta forma, a detecção destes genes em *Pseudallescheria boydii* acrescenta dados às pesquisas e destaca a importância de se explorar diferentes rotas de degradação de hidrocarbonetos e ácidos graxos. A amplificação do fragmento selecionado confirma a presença do gene no fungo deteriorogênico em estudo e mostra uma possível enzima envolvida na degradação dos alcanos e ésteres para serem metabolizados. Este resultado serve de base para estudos futuros, como a expressão destes genes durante o crescimento fúngico.

## 4.5 CONCLUSÃO

O crescimento de *Pseudallescheria boydii* mostrou maior formação de biomassa na presença da mistura B10 ao longo dos 45 dias de incubação em comparação com B0 e B100. O diesel puro não proporcionou condições favoráveis para crescimento dentre os três combustíveis testados. A degradação dos combustíveis avaliada pela análise de FTIR/ATR mostrou diminuição do pico da carbonila e aumento do pico de produto de degradação nas amostras de B10 na proporção 1:6 aos 20 dias de experimento e nas amostras de B100 na mesma proporção aos 45 dias. Os resultados de RMN C13 e de FTIR/ATR foram concordantes com relação ao produto intermediário da degradação apresentar função ácido caborxílico. Pelos resultados das medidas de tensão superficial, não foi observada produção de biossurfactantes pelo fungo.

A detecção do gene de Citocromo P450 e de carboxilesterase possibilita o entendimento de enzimas relacionadas (monoxigenase e lipase) à degradação de hidrocarbonetos e ésteres por fungos deteriogênicos. Com a amostragem por microextração em fase sólida para análise por cromatografia gasosa, detectamos a presença de compostos provenientes da degradação dos combustíveis biodiesel puro e de frações do diesel e biodiesel da mistura B10, metabólitos ácidos e aditivos. Estes dados sugerem a migração de compostos da fase oleosa para a fase aquosa. As três proporções de fase oleosa em relação à fase aquosa estabelecidas permitiram demonstrar que a menor coluna de combustível sobre o meio mínimo mineral proporcionou maior crescimento fúngico no tempo final do experimento.

## 5. CAPÍTULO 2

### **Avaliação da capacidade deteriogênica de *Meyerozyma guilliermondii* durante estocagem simulada em biodiesel e mistura B10.**

Gabriela Boelter<sup>a</sup>, Juciana Clarice Cazarolli<sup>a</sup>, Sabrina Anderson Beker<sup>a</sup>, Patrícia Dörr de Quadros<sup>a</sup>, Ana Paula Guedes Frazzon<sup>a</sup>, Camila Correa<sup>b</sup>, Marco Flôres Ferrão<sup>b</sup>, Carolina Faganello Galeazzi<sup>b</sup>, Tânia Mara Pizzolato<sup>b</sup>, Fátima Menezes Bento<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, Universidade Federal do Grande do Sul, (Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brasil)

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (Avenida Bento Gonçalves 9500, Agronomia, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil)

## RESUMO

No Brasil, tem se observado o uso crescente de biodiesel ao diesel, sendo a mistura obrigatória B7 (7% de biodiesel ao diesel) utilizada em todo território nacional. Uma vulnerabilidade do biodiesel durante o armazenamento, é a possibilidade de degradação tanto abiótica quanto biótica. Devido à sua composição (ésteres de ácidos graxos), os microrganismos que naturalmente estão presentes juntamente com água, podem degradar e alterar o produto final. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade deteriogênica (crescimento, degradação e detecção de genes) relacionados com a degradação de biodiesel puro (B100) e mistura B10 de *Meyerozyma guilliermondii* em meio mineral durante estocagem simulada. Foram acrescentados 20% de B10 ou B100 à 30 mL de meio mínimo mineral BH estéreis em frascos de 150 mL. Para a condição de tratamento, foram inoculadas  $10^2$  células mL<sup>-1</sup> e na condição de controle não foi adicionado inóculo. Os frascos foram incubados a 28°C sob agitação a 120 rpm por 10 dias. O crescimento da levedura foi acompanhado pela formação de biomassa (método gravimétrico) e por contagem de UFC mL<sup>-1</sup>. A fase aquosa foi analisada pelas metodologias de produção de lipase (ágar tributirina), medidas de pH e de tensão superficial, índice de emulsificação e GC-MS com amostragem por SPME. A detecção de genes funcionais foi realizada por PCR. A degradação de ésteres e hidrocarbonetos foi avaliada por espectroscopia de infravermelho. A levedura apresentou aumento de três logaritmos em seu crescimento, não sendo observada diferença significativa na curva de crescimento entre B10 e B100. Foi produzida lipase a partir de 6 horas de incubação. O pH diminuiu consideravelmente no tempo final do tratamento de B100 (de 7,2 para 3,48). As medidas de tensão superficial não indicaram a eficiência de produção de biossurfactantes pela levedura. Ambos tratamentos com B10 e B100 mostraram emulsão entre a fase oleosa e aquosa. O gene de lipase e Citocromo P450 foram amplificados. Foram identificados compostos como álcoois, ésteres, ácidos, sulfurados, cetonas e fenóis na fase aquosa por cromatografia. *Meyerozyma guilliermondii* apresentou crescimento em B10 e B100 e meio mineral, porém não foi observada a degradação característica das frações de hidrocarbonetos e ésteres.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O uso de biocombustíveis é ambientalmente vantajoso, pois são provenientes de fontes renováveis que não são poluentes, comparados aos combustíveis fósseis. O biodiesel é constituído de ácidos graxos derivado da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais. No Brasil, desde 2014, a formulação do diesel comercial é a mistura B7 (7% de biodiesel ao diesel) (ANP, 2016).

O biodiesel e diesel podem sofrer biodeterioração por microrganismos que utilizam os hidrocarbonetos ou ésteres de ácidos graxos como fonte de carbono. Estes microrganismos podem ser bactérias, fungos e arqueas que produzem enzimas capazes de degradar estes substratos. Essas enzimas podem ser oxigenases e lipases (Pepper *et al.*, 2011). Os biossurfactantes também estão envolvidos, reduzindo a tensão superficial do substrato (Perfumo *et al.*, 2009).

A biodeterioração de combustíveis por microrganismos pode afetar a qualidade final do produto e dos sistemas envolvidos na distribuição e armazenamento. O desenvolvimento de biofilmes e borra biológica na interface óleo-água ou aderidos às paredes do tanque está envolvido com o contato com água acumulada no fundo de tanques e caminhões. Este acúmulo pode ocorrer por problemas de vedação, ou mesmo pela condensação da umidade nas paredes internas (Bento *et al.*, 2010; Passman, 2013; ASTM 2014).

A natureza microbiana da borra biológica tem mostrado a importância da participação dos fungos deteriorogênicos (Ulfig *et al.*, 2006; Bückner *et al.*, 2011). Portanto, investigações devem ser conduzidas sobre a cinética de crescimento e sobre genes relacionados à degradação e deterioração dos combustíveis e biocombustíveis especialmente durante armazenamento simulado.

Fungos e leveduras apresentam melhor desempenho em degradar óleos sobre condições que não favorecem o crescimento de bactérias. Leveduras acumulam ácidos graxos no interior do material celular. Poros e canais presentes na superfície celular auxiliam na penetração de hidrocarbonetos que se movimentam em direção à membrana plasmática. O uso de metodologias que avaliam o impacto do crescimento microbiano sobre o combustível como a degradação de ésteres e hidrocarbonetos, e a produção de metabólitos pelos

microrganismos, pode auxiliar na adoção de medidas para minimizar e solucionar os problemas derivados da contaminação microbiana. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade deteriogênica (crescimento, degradação e detecção de genes) relacionado com a degradação do biodiesel puro (B100) e a mistura B10 de *Meyerozyma guilliermondii* em meio mineral durante estocagem simulada.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 Combustíveis

O óleo diesel A (B0) com baixo teor de enxofre (10 ppm) utilizado para este estudo e o biodiesel (B100) 100% soja foram fornecidos pela Ipiranga Produtos de Petróleo S/A (Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil) (Anexos 9.7 e 9.8). A mistura diesel e biodiesel B10 foi preparada no LAB-BIO/UFRGS (Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis) utilizando-se proveta graduada previamente desinfetada com álcool 70% adicionando-se 10% de biodiesel em 90% de diesel. Esta proporção de biodiesel/diesel foi avaliada por ser a mistura mais próxima à da matriz energética brasileira atual (B7). Foram conduzidos tratamentos com diesel puro (B0), biodiesel puro (B100) e mistura B10.

### 5.2.2 Esterilização

Para a esterilização dos combustíveis utilizou-se frasco Kitassato previamente esterilizado em autoclave (121°C e 1 atm por 15 minutos). O diesel e biodiesel foram filtrados em membrana de celulose com porosidade de 0,22 µm (Milipore) por sistema a vácuo e armazenados em geladeira (4°C) em frascos de vidro âmbar esterilizados para evitar foto-oxidação.

### 5.2.3 Meio Mínimo Mineral

Como fase aquosa foi utilizado o meio mínimo mineral BH (Bushnell & Haas, 1941). É composto por água destilada e enriquecido com sais minerais. Seu pH inicial é de 7,2. O protocolo com os componentes encontra-se no Anexo 9.3.

### 5.2.4 Microrganismo

A levedura utilizada, *Meyerozyma guilliermondii*, pertence ao Filo Ascomycota e à Família Debaryomycetaceae. Foi isolada de óleo diesel (Bento, & Gaylarde, 2001). A identificação foi realizada através da amplificação da região ITS-5.8S-ITS2 com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores ITS-1 e ITS-4, e a seguir submetido a sequenciamento automático no sistema Amersham MegaBACE 1000, usando os protocolos padronizados na Rede Genoma Brasileira. As sequências geradas pelo sequenciamento foram comparadas com o banco de dados BLAST.

### 5.2.5 Inóculo

Para o preparo do inóculo, uma alçada de levedura cultivada em ágar GYMP (Anexo 9.9) foi acrescentada em tubos para centrífuga contendo 30 mL de caldo GYMP (Anexo 9.10). Os tubos foram mantidos em agitador, a 28°C por 48 horas. Após, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos. O caldo foi descartado e o pellet foi lavado 3 vezes com solução salina 0,85%. Foi acrescentado 30 mL de solução salina 0,85% ao tubo contendo pellet que permaneceu em agitador nas mesmas condições, por 24 horas.

Depois deste período, os tubos foram centrifugados e a solução salina foi descartada. Foi acrescentado cerca de 5 mL de água destilada estéril. Foi feita a contagem de células da suspensão em câmara de Neubauer até chegar-se a uma concentração de  $10^2$  células mL<sup>-1</sup>.

### 5.2.6 Condições de estocagem simulada com biodiesel e mistura B10

Para simular os tanques de estocagem e transporte de combustíveis, foram utilizados frascos de vidro com capacidade de 150 mL. A fase aquosa foi composta por meio mineral Bushnell & Haas como descrito no item 5.1.3. Foi utilizada a proporção de 20% de fase oleosa em relação à fase aquosa (6 mL de combustível e 30 mL de meio mínimo mineral BH) com o intuito de ter uma situação em que se encontra uma pequena camada de combustível sobre a água.

Para a montagem dos microcosmos, os frascos utilizados para o experimento foram autoclavados (121°C, 1 atm por 15 minutos) juntamente com o meio mineral Bushnell & Haas. Em câmara de fluxo vertical, foi adicionado o inóculo contendo  $10^2$  células mL<sup>-1</sup> aos frascos e em seguida, os combustíveis B10 e B100 separadamente, na condição de tratamento. Para a condição de controle, o microcosmo foi constituído de fase aquosa e oleosa sem inóculo (Figura 24).

O experimento foi realizado em triplicata com repetições destrutivas. Os frascos foram incubados em agitador a 28°C pelo período de 10 dias com análises nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 240 horas.

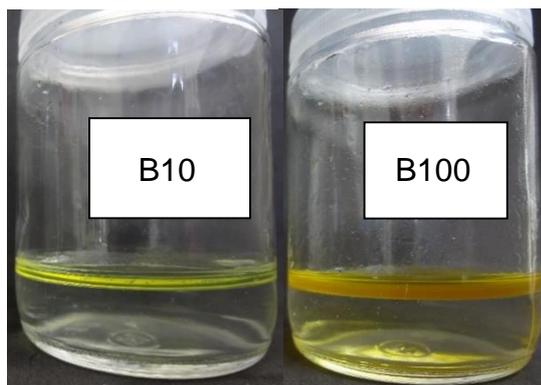


Figura 24. Microcosmo contendo 20% de B10 e B100 em meio mínimo mineral BH. Fonte: Gabriela Boelter, 2016

#### 5.2.7 Coletas de fase oleosa, fase aquosa e biomassa

A cada tempo amostral, todo o conteúdo do microcosmos foi separado em funil de separação de vidro com capacidade de 500 mL. Nos tempos amostrais foi coletado em tubos de microcentrífuga 1 mL de fase oleosa, com o intuito de detectar o máximo percentual de degradação pelo fungo. O restante da fase oleosa foi descartado. Aproximadamente 25 mL de fase aquosa foram coletados em tubos de centrífuga para posteriores análises. Para extração de DNA e para método gravimétrico (peso seco), foi separado 1 mL de fase aquosa em tubos de microcentrífuga para cada análise. Para cromatografia gasosa, foram filtrados com membrana de PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$ , cerca de 2 mL e armazenados em frascos de vidro com capacidade de 15 mL e tampas de silicone.

#### 5.2.8 Análises de fase aquosa

##### 5.2.8.1 Curva de crescimento

Para acompanhar o aumento da população de levedura, foi utilizado o método de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL<sup>-1</sup>). A cada tempo amostral eram coletados 100  $\mu\text{L}$  de fase aquosa após diluição seriada para a contagem de UFC.

##### 5.2.8.2 Quantificação da biomassa

Com o objetivo de observar a biomassa formada em meio mínimo mineral BH e combustível, foi utilizado o método gravimétrico (peso seco). Foi coletado 1 mL

da fase aquosa dos tempos 0, 24, 120 e 240 horas em tubos de microcentrífuga previamente secos em estufa a 60°C por 24 horas e foi anotado seu peso inicial. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi mantido em estufa a 30°C por 4 dias para secar o excesso de fase aquosa. Assim, os tubos foram pesados novamente. A quantidade de biomassa foi obtida pelo cálculo da subtração do peso final pelo peso inicial dos tubos, convertendo o resultado para mg mL<sup>-1</sup>.

#### 5.2.8.3 Detecção da produção de lipase

Para esta análise foram utilizadas placas de Petri com ágar contendo tributirina (Anexo 9.5). Foram feitas picadas com agulha de platina com as amostras em cada tempo amostral. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas (Carrasco *et al.*, 2012). O resultado positivo foi observado pela formação de halo translúcido ao redor da levedura.

#### 5.8.2.4 Medidas de pH

Para a detecção da produção de metabólitos ácidos ou básicos pelos microrganismos, realizou-se medidas de pH em todos os tempos amostrais com pHmetro Digimed, colocando-se o eletrodo em tubos com capacidade de 15 mL, após a fase aquosa ter sido centrifugada a 1000 rpm por 15 minutos e estar em temperatura ambiente.

#### 5.2.8.5 Microextração em fase sólida e Cromatografia gasosa

A amostragem por microextração por fase sólida-headspace (HS-SPME) foi realizada em frascos de vidro com capacidade de 15 mL e o volume de amostra de fase aquosa foi de 2 mL. Foi utilizada uma fibra de PDMS e aquecimento a 60 °C por 5 minutos antes da exposição da fibra. O tempo de exposição da fibra foi de 15 minutos. As análises foram realizadas em triplicata por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS, Shimadzu, modelo QP-2010 SE) equipado com a coluna RTX - 5MS (30.0m x 0.25 um x 0.25 mm). A variação da temperatura está disposta na Tabela 13. Os compostos presentes na amostra foram tentativamente identificados por comparação dos seus espectros de massas com aqueles da

biblioteca NIST.

Tabela 13. Rampa de temperatura de GC-MS.

Varição (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo (min)
-	70,00	2,00
10,00	200,00	5,00
10,00	270,00	8,00

Esta análise visa caracterizar a natureza dos metabólitos dos contaminantes envolvidos no processo de degradação, como metabólitos ácidos que podem causar a diminuição do pH do meio mineral ou ainda de compostos provenientes da migração da fase óleo. Foram analisadas amostras do tempo inicial e final do experimento.

#### 5.2.8.6 Tensão superficial

Com o intuito de detectar a produção de substâncias surfactantes pelo fungo, em todos os tempos amostrais foi feita a medição de tensão superficial pelo método da Placa de Wilhelmy. Em temperatura ambiente separou-se 10 mL das amostras centrifugadas (6000 rpm por 15 minutos) dos tempos 0, 72 horas (primeiro momento em que começou a se apresentar emulsificações) e 240 horas para a análise. Foi utilizado um medidor de tensão superficial digital (Gibertini, Milão, Itália). Os valores de calibração utilizados são 72,0 mN m<sup>-1</sup> para água destilada e 24,0 mN m<sup>-1</sup> para etanol.

#### 5.2.8.7 Índice de emulsificação (IE<sub>24</sub>)

O índice de emulsificação é determinado pela adição de 2 mL da fase aquosa centrifugada e não centrifugada à 2 mL de fase oleosa em tubos de ensaio com fundo chato (Bento *et al*, 2008). Foram acrescentados 200 µL de solução 0,05% de rosa de bengala com o objetivo de ressaltar a possível emulsificação formada. Desta forma, a mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e os frascos mantidos em repouso por 24 horas. Após esse período, o índice de emulsificação (%) é obtido pela medida da coluna emulsificada, dividida pela altura total (4 mL) e multiplicada por 100 (Cooper & Goldenberger, 1987).

#### 5.2.8.8 Avaliação de hidrofobicidade celular

Com o valor de hidrofobicidade celular, podemos avaliar a degradação do combustível e a produção de biossurfactante. Após 240 horas de incubação, foram separados 10 mL de fase aquosa em tubos de centrífuga os quais foram centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos. Foi descartado o sobrenadante e o pellet foi lavado 2 vezes com tampão salino (16,9 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,3 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e ressuspendido no mesmo tampão de forma a se obter uma OD (densidade óptica) de 0,5 em comprimento de onda de 600nm (adaptado de Rosenberg *et al.*, 1980).

Foram acrescentados 2 mL da suspensão celular e 100 µL de clorofórmio em tubos de vidro. Os tubos foram agitados em vortex por 3 minutos e deixados em repouso por 1 hora. A OD das amostras foi medida a 600 nm. A hidrofobicidade é expressada em percentual de aderência ao clorofórmio pela equação:

$$\text{Hidrofobicidade (\%)} = 100 \times \left[ 1 - \left( \frac{\text{OD fase aquosa}}{\text{OD inicial da suspensão celular}} \right) \right]$$

#### 5.2.8.9 Coloração de Gram

Após o crescimento de *M. guilliermondii* em ágar GYMP por 48 horas e em meio BH e B10 e meio BH e B100 por 240 horas, foi feita a coloração de Gram para observar a diferença de crescimento em meio rico e combustível. Da colônia isolada em ágar GYMP foi feito esfregaço em lâmina de vidro. A partir do crescimento em meio BH e combustíveis foi separada um gota com alça de platina na lâmina. Posteriormente, seguiu-se o procedimento da coloração de Gram (Martins, 2001).

### 5.2.9 Análises da fase oleosa

#### 5.2.9.1 Espectroscopia de infravermelho

As análises nos tempos 0, 48, 96, 168 e 240 horas para avaliar a degradação das cadeias carbônicas dos combustíveis foram realizadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR/ATR) em espectrofotômetro Cary 630 Agilent Technologies FTIR acoplado em acessório de reflectância total atenuada horizontal (HATR). Todos os espectros de FTIR/ATR foram suavizados, normalizados e aplicada a primeira derivada (algoritmo Savistky-Golay, 15 pontos, polinômio de segunda

ordem).

#### 5.2.10 Detecção de genes de degradação

##### 5.2.10.1 Extração de DNA

Foram separados em microtubo de centrífuga, 1 mL da fase aquosa contendo inóculo de *Meyerozyma guilliermondii* em contato com B10 e B100. Foi centrifugado e descartado o sobrenadante. O pellet foi utilizado para a extração de DNA segundo protocolo de CTAB (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

##### 5.2.10.2 Detecção de genes de Citocromo P450 e lipase

A identificação de um fragmento de DNA que codifica o gene CYP da família CYP52 foi realizada a partir do DNA genômico, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores P450DegHelixFor (5'-GCHGGWMGAGAYACCACHGC-3') e P450DegHemeRev (5'-TGDCCHARRCARATTCKWGGWCC-3') (Van Bogaert *et al.*, 2009). Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *Candida bombicola* fornecida pelo ICB/UFMG.

A amplificação foi realizada em reações de PCR de 25 µL contendo 100 ng de DNA, 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Ludwig), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Ludwig), 200 µM de dNTPs, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig) e água Milli-Q para completar a reação. As condições de amplificação foram 4 min a 94°C, 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C, 2 min a 72°C; seguidos por 7 min a 72°C. O produto de PCR esperado de 401 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose com marcador molecular de 100 pb (Invitrogen) e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

A identificação de um fragmento de DNA que codifica o gene de triacilglicerol lipase (TGL2) foi realizada a partir do DNA genômico, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Lip-Mey *Forward* (5'- AAYGAYGGNYTNGTNWSNGT-3') e Lip-Mey *Reverse* (5'- TCCARTTDATNARRTCNARRTGRTC -3'). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base nos genomas de *Meyerozyma guilliermondii* (GenBank: EDK41553.2) e *Saccharomyces cerevisiae* S288c (NCBI: NM\_001180366.1). O genoma de *M. guilliermondii* foi utilizado para detectar a sequência de aminoácidos correspondente à enzima em estudo. Após ser

traduzida para nucleotídeo, sua sequência foi alinhada com a região do genoma de *S. cerevisiae* codificada para o gene alvo. Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (Castrillón, 2012).

Para amplificação do gene de triacilglicerol lipase foram utilizados 1 µL de DNA, 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Ludwig), 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Ludwig), 200 µM de dNTPs, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig) e água Milli-Q para completar a reação. As condições de amplificação foram 3 min a 94°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C, 45 s a 72°C; seguidos por 4 min a 72°C.

O controle negativo teve adição de água na reação de amplificação, substituindo o DNA. Para o controle positivo foi utilizada uma cepa de *Candida bombicola* e uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em caldo malte. O produto de PCR esperado de 100 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose com marcador molecular de 100 pb (Invitrogen) e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

#### 5.2.11 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas de formação de biomassa, pH, condutividade e tensão superficial, foi utilizado o programa Excel XLSTAT 2015.1. Foram realizadas análise de variância e teste de Duncan e Tukey em nível de 5% de significância em todos os tempos amostrais. A análise por componentes principais (PCA) foi realizada para determinar a relação entre pH, peso seco e tensão superficial.

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Crescimento do fungo leveduriforme em biodiesel e mistura B10

Nos tempos iniciais de crescimento de *Meyerozyma guilliermondii* em B10 e meio mínimo mineral BH, foi possível observar uma fase de aclimação nas primeiras 9 horas de incubação. Após este período, observou-se uma fase exponencial até 48 horas, com aumento de três logs. Depois de 72 horas houve um aumento para  $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  mantendo-se a fase estacionária até as 240 horas de experimento.

Em B100, a fase de aclimação estendeu-se até 12 horas de incubação. Após, a população das leveduras entrou em fase exponencial, com o aumento de 3 logs até atingir  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . A partir de 96 horas, manteve-se em fase estacionária em  $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 25).

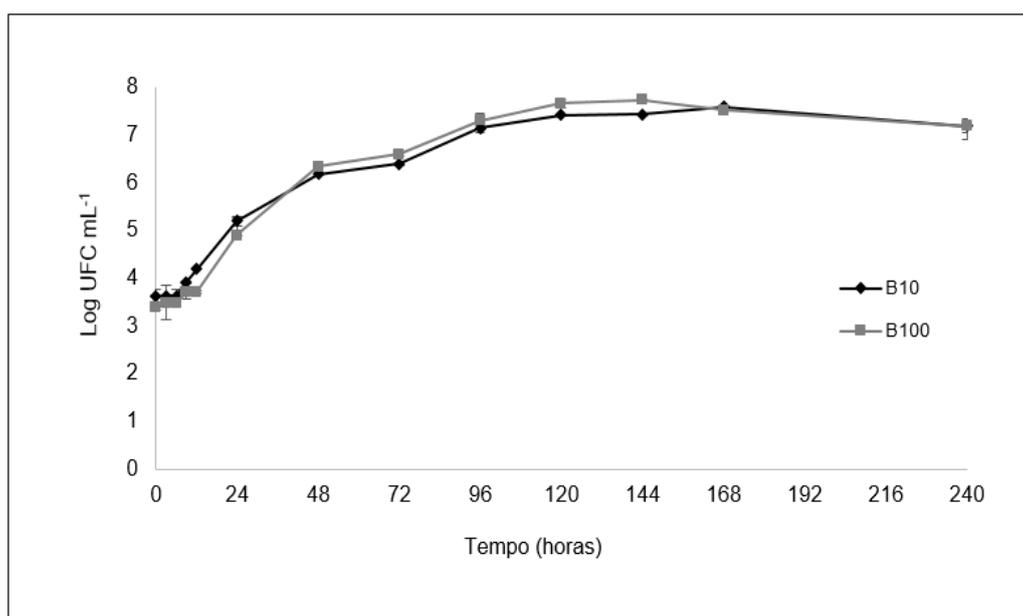


Figura 25. Curva de crescimento ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ) de *Meyerozyma guilliermondii* em meio mínimo mineral BH contendo B10 e B100.

Para verificarmos a formação de biomassa na fase aquosa foi realizado, também, o método gravimétrico. Em B10, após 240 dias, o peso seco das leveduras foi de  $3,2 \text{ mg mL}^{-1}$  e em B100 de  $4,9 \text{ mg mL}^{-1}$ , não diferindo significativamente entre os dois tratamentos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 14).

Tabela 14. Valores de peso seco ( $\text{mg mL}^{-1}$ )

Tempo de incubação	B10	B100
0	$0,50 \pm 0,15^*$	$0,50 \pm 0,14$
24	$0,83 \pm 0,09$	$1,35 \pm 0,12$
120	$1,50 \pm 0,17$	$2,40 \pm 0,10$
240	$3,20 \pm 0,13$	$4,91 \pm 2,03$

\*Os dados estão expressados em média  $\pm$  DP. O valor-p foi obtido por ANOVA e teste de Tukey

A formação da biomassa pode ser observada aderida às paredes dos microcosmos no tempo final do experimento, nas condições de tratamento com a presença de B10 e B100. A emulsificação do combustível se tornou evidente, assim como a turbidez do meio mínimo mineral, representadas na Figura 26. Na Figura 27 é possível observar a coloração de Gram da levedura em meio rico e mineral.

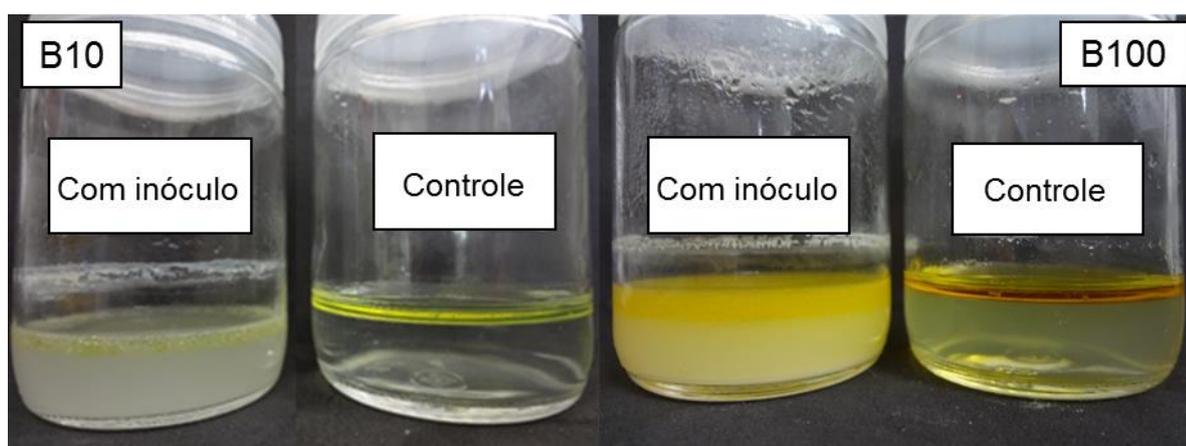


Figura 26. Aspecto dos microcosmos contendo B10 e B100 nas condições com inóculo e controle após 240 horas.

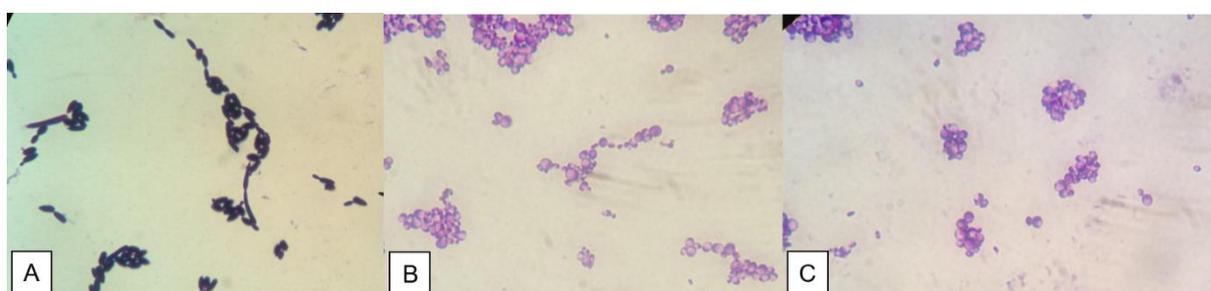


Figura 27. Imagens da coloração de Gram de *Meyerozyma guilliermondii* (Aumento de 100x). (A) ágar GYP após 48 horas; (B) B10 e meio BH após 240 horas; (C) B100 e meio BH após 240 horas. Fonte: Gabriela Boelter, 2016.

### 5.3.2 Fase aquosa

#### 5.3.2.1 Detecção da produção de lipase

A produção de lipase pela levedura foi detectada pela presença de halo translúcido ao redor da colônia. Nos tratamentos contendo B10 e B100 nos tempos iniciais, o resultado foi negativo. No entanto, a partir das 6 horas de incubação, foi possível realizar a detecção da lipase em placa (Tabela 15). Na condição de controle, o resultado foi negativo para todos os tempos.

Tabela 15. Detecção da produção de lipase por *Meyerozyma guilliermondii* em meio mínimo mineral BH contendo B10 e B100.

<b>Tempo de incubação (horas)</b>	<b>B10</b>	<b>B100</b>
<b>0</b>	-	-
<b>3</b>	-	-
<b>6</b>	+	+
<b>9</b>	+	+
<b>12</b>	+	+
<b>24</b>	+	+
<b>48</b>	+	+
<b>72</b>	+	+
<b>96</b>	+	+
<b>120</b>	+	+
<b>144</b>	+	+
<b>168</b>	+	+
<b>240</b>	+	+

(+) presença de halo translúcido (-) ausência de halo translúcido

#### 5.3.2.2 Medida de pH

Os valores de pH da fase aquosa foram acompanhados em todos os tempos amostrais. Com a mistura B10, estes valores se mantiveram aproximadamente constantes, apresentando média de 6,75. O menor valor observado foi de 6,10 nas 168 horas e o maior nos tempos 3 e 9 horas (7,13). Na condição de controle, sem adição de inóculo, houve maior diminuição de pH inicial de 7,20 para

6,65 no tempo 96 horas, mantendo-se próximo ao valor inicial nos demais tempos (Figura 28). As condições de tratamento e controle apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no tempo final de incubação.

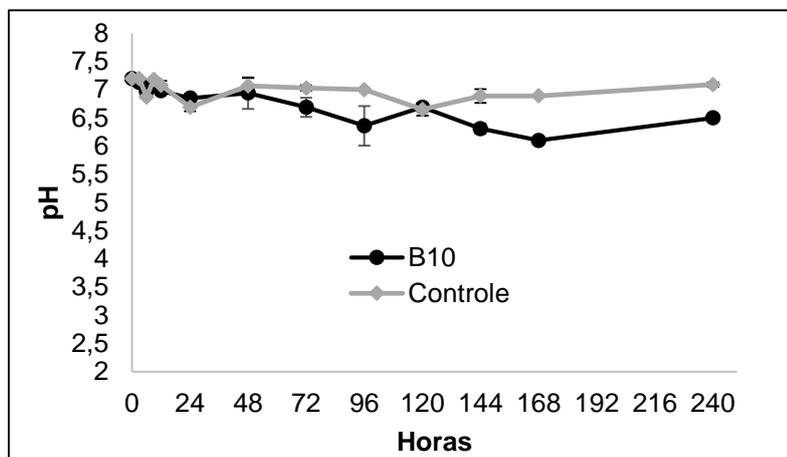


Figura 28. Medidas de pH do meio mínimo mineral BH com B10 ao longo de 240 horas do tratamento e controle.

Com B100, o valor de pH manteve-se constante até 168 horas, mostrando aumento apenas nas 24 horas (7,3). No tempo final (240 horas) o pH diminuiu para 3,48, diferenciando significativamente do controle e do tempo inicial. Ao longo do tempo, a média das medidas de pH foi de 6,6. Na condição de controle, o pH ficou em média de 7,0. Comparando os valores dos tempos inicial e final nas condições de tratamento e controle dos combustíveis B10 e B100, apenas a amostra dos 240 dias de B100 com inóculo apresentou diferença significativa entre as demais condições (Figura 29).

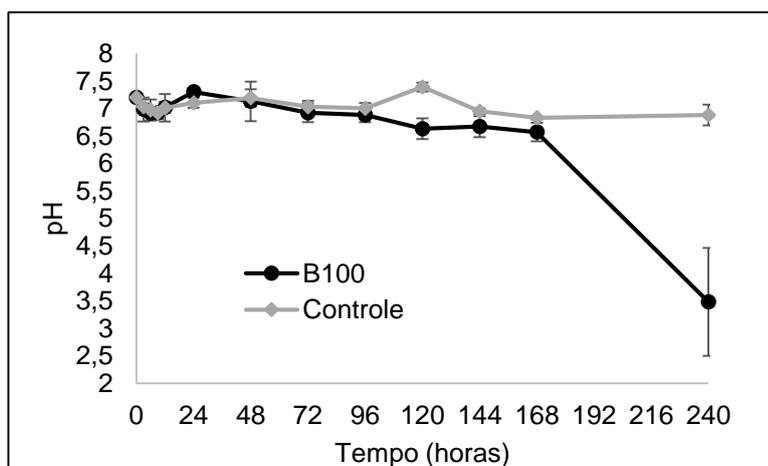


Figura 29. Medidas de pH do meio mínimo mineral BH com B100 ao longo de 240 horas do tratamento e controle.

### 5.3.2.3 Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa

Após a amostragem por SPME e análise de GC-MS das amostras de fase aquosa do tempo final, assim como os controles, foram detectados e selecionados os espectros dos possíveis compostos oriundos da degradação dos combustíveis ou de metabólitos produzidos pela levedura (Tabelas 16 e 17). Os principais compostos identificados na fase aquosa foram alcanos, álcoois, aldeídos, ésteres, ácidos, sulfurados, cetonas e fenóis. Procurou-se destacar os compostos que são resultado da degradação do diesel e biodiesel e metabólitos produzidos pela levedura. No entanto, é importante destacar que muitos compostos da degradação abiótica migram para a fase aquosa e podem ser visualizados na condição do controle.

Tabela 16. Compostos presentes na fase aquosa em contato com **B10** do tempo 240 horas e seus respectivos controles.

<b>Amostra</b>	<b>Compostos</b>
<b>T240</b>	<b>11,14-eicosadienoato de metila; 1-heptanotiol; 1-metil-piperazina; 1-octanotiol; 2,5-dimetil-tiofeno; 3-metil-1-butanol; 4-hexeno-3-ol, 2-metil; 4-metil-ciclohexanol; ácido acético ciclohexano; ácido butanóico; ácido ftálico; ácido sulfuroso; dodecano; eicosano; fenol, 2,5-bis(1,1-dimetiletil); fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-metilpropil); heptadecano; hexadecano; metil-ciclohexanol; naftaleno, 1,2,3,4-tetrahidro-5,6-dimetil; naftaleno, 1,2,3,4-tetrahidro-6-metil; naftaleno, decahidro-2,6-dimetil; pentadecano, 2,6,10,14-tetrametil; sulfeto de benzila; tetradecano; tiofeno; triacontano; tridecano; undecano, 4,7-dimetil; 1-etil-4-metil-ciclohexano; ácido decanóico; ácido pentanóico; ácido propanóico; ciclohexanotiol; hexanotiol; metil elaidato; naftaleno, 1,2,3,4-tetrahidro-5-metil; octanotiol;</b>
<b>T 240 Controle</b>	<b>ácido 8-11-octadecadienoico; metil-ciclohexanol; naftaleno, 1,2,3,4-tetrahidro; 1-hexanotiol; ácido esteárico; ácido linoléico; ácido palmítico; ácido pentanedióico (2,4-di-t-butilfenil); benzenotiol; fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); 1-etil-4-metil-ciclohexano; ácido decanóico; ácido pentanóico; ácido propanóico; ciclohexanotiol; hexanotiol; metil elaidato; naftaleno, 1,2,3,4-tetrahidro-5-metil; octanotiol</b>

**Negrito:** compostos presentes na condição de tratamento. T 240: 240 horas.

Tabela 17. Compostos presentes na fase aquosa em contato com **B100** do tempo 240 horas e seus respectivos controles.

Amostra	Compostos
<b>T240</b>	<b>(E)-2-decenol; 2-undecenal; 3-metil-1-butanol; ácido adípico; ácido butanóico; ácido heptadecanóico; ácido propanoico; ácido salicílico, 2-etilhexil éster; hexanol; elaidato de metila; metil palmitoleato; 9,15- ácido octadecadienóico; ácido 2-etil-hexanóico; ácido dodecanóico; ácido eicosadienóico; ácido esteárico; ácido nonanóico; ácido octanodióico; ácido palmítico; ácido pentadecanóico; ácido pentanóico; ácido tetradecanóico; benzenotiol; éter caprílico; fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil);fenol, 2,5-bis(1,1-dimetiletil); metil 5,13- docosadienoato; metil hexadecanoato; sulfeto de benzila</b>
<b>T 240 Controle</b>	<b>ácido adípico; ácido propanóico; aldeído láurico; ciclohexanometanol; fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-metilpropil); hexanol; metil-octadecadienoato; tert-butil-p-benzoquinona; 9,15- ácido octadecadienóico; ácido 2-etil-hexanóico;ácido dodecanóico; ácido eicosadienoico; ácido esteárico; ácido nonanóico; ácido octanodióico; ácido palmítico;ácido pentadecanóico; ácido pentanóico; ácido tetradecanóico;benzenotiol; éter caprílico; fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil);fenol, 2,5-bis(1,1-dimetiletil); metil 5,13- docosadienoato; metil hexadecanoato; sulfeto de benzila</b>

**Negrito:** compostos presentes na condição de tratamento. T 240: 240 horas.

As amostras do tempo final de experimento proporcionam uma melhor abrangência dos possíveis metabólitos produzidos ou consumidos, comparando com os controles respectivos. Entre os compostos identificados na fase aquosa, que migraram da condição de B100 estão: ácido adípico, ácido esteárico, éter caprílico e elaidato de metila. Alguns são metabólitos da rota de biossíntese de ácidos graxos como ácido decanóico, dodecanóico e palmítico (De Azambuja, 2016). Alguns dos compostos provenientes do diesel (presente na mistura B10) são 4-hexeno-3-ol, 2-metil; tridecano e doidecano. Alguns antioxidantes também foram detectados como tert-butil-p-benzoquinona e fenol, 2,4-bis (1,1-dimetiletil).

Os compostos detectados nas amostras controle e que não estão presentes nos tratamentos podem ter sido consumidos ao longo das 240 horas de incubação. Entretanto, outros se mostraram presentes em ambas as condições,

indicando que podem ter sido produtos de degradação abiótica que não foram consumidos e se preservaram até o final do experimento.

#### 5.3.2.4 Tensão superficial

Na Tabela 18 podemos observar os valores de tensão superficial do tempo 0, 72 e 240 horas da fase aquosa em contato com os combustíveis B10 e B100. Na mistura B10 verificamos que houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as medidas do tempo inicial e final dos tratamentos, sendo observado valor inicial de  $52,30 \text{ mN m}^{-1}$  e final de  $41,59 \text{ mN m}^{-1}$ . Entretanto, a comparação aos 240 dias de incubação entre tratamento e controle não mostrou diferença ( $p > 0,05$ ).

As amostras contendo B100 como fase oleosa, diferenciaram significativamente entre o tempo inicial e final, apresentando medidas entre  $50,56 \text{ mN m}^{-1}$  e  $40,82 \text{ mN m}^{-1}$ . A análise entre tratamento e controle do tempo final não mostrou diferença significativa, assim como o tratamento entre B10 e B100.

Tabela 18. Valores das medidas de tensão superficial ( $\text{mN m}^{-1}$ ) da fase aquosa dos tempos 0, 72 e 240 horas de incubação com combustíveis B10 e B100.

Tempo de incubação	B10	Controle B10	B100	Controle B100
<b>0 horas</b>	$52,30 \pm 0,20^*$	$52,21 \pm 0,32$	$50,56 \pm 0,50$	$50,53 \pm 0,15$
<b>72 horas</b>	$47,80 \pm 3,14$	$39,55 \pm 0,88$	$37,17 \pm 0,28$	$36,84 \pm 0,05$
<b>240 horas</b>	$41,59 \pm 1,53$	$39,72 \pm 1,23$	$40,82 \pm 2,10$	$37,57 \pm 2,18$

\* Os dados estão expressados em média  $\pm$  DP. O valor-p foi obtido por ANOVA e teste de Tukey

#### 5.3.2.5 Avaliação da hidrofobicidade celular

O percentual de hidrofobicidade celular é uma técnica utilizada para avaliar o grau de degradação de compostos orgânicos hidrofóbicos, como combustíveis. Quanto maior este percentual, maior a produção de biossurfactante pela célula que pode estar ligado à sua parede e assim, interagir com o contaminante e/ou aderir-se a superfícies hidrofóbicas.

Após 240 horas, foram observados os percentuais celulares em meio mínimo mineral e nos dois diferentes combustíveis (Tabela 19). Em contato com a mistura B10, o percentual de hidrofobicidade celular foi de 90% e com B100 foi de 91,5%, não mostrando diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Tabela 19. Percentagem de hidrofobicidade celular em B10 e B100.

Tratamento	% Hidrofobicidade
<b>B10</b>	90,0
<b>B100</b>	91,5

### 5.3.2.6 Índice de emulsificação

A medição do índice de emulsificação foi realizada com o objetivo de avaliar a produção de emulsificante ligado à parede celular ou liberado extracelularmente (sobrenadante na ausência de célula) (Figura 30). Foi observada emulsificação entre a fase oleosa e aquosa somente nos tratamentos envolvendo B10 sem centrifugação da fase aquosa (presença de células) com valor de 59,09% e B100 na presença de células com 45,4% (Tabela 20).

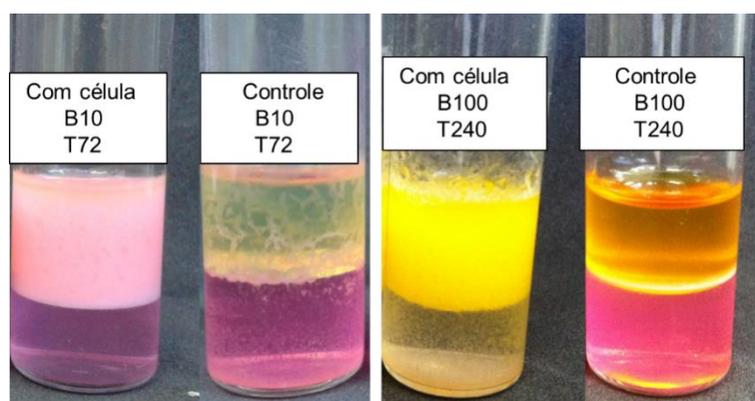


Figura 30. Aspecto da emulsão formada após 24 horas ( $IE_{24}$ ) com amostra proveniente do meio mineral com B10 e B100 após 72 e 240 horas de incubação com e sem *M. guilliermondii*.

Tabela 20. Valores do Índice de emulsificação (%) da fase aquosa dos tempos 72 e 240 horas com combustíveis B10 e B100.

Tempo de incubação	B10 presença de células	B10 ausência de células	B100 presença de células	B100 ausência de células
<b>72 horas</b>	59,09 ± 2,42	-	-	-
<b>240 horas</b>	-	-	45,40 ± 0,20	-

- : ausência de emulsificação.

### 5.3.2.7 Análise de componentes principais

Para correlacionar os resultados de peso seco, tensão superficial e pH, foi realizada a PCA e avaliado o coeficiente de Spearman. Com base no gráfico, observa-se que as amostras de tratamento de B10 e B100 do tempo final, com maior peso seco, demonstraram menores valores de pH e tensão superficial que amostras do tempo inicial e amostras controle. A correlação das medidas de tensão superficial e pH mostrou-se positiva, pois em ambas análises, a menor medida foi no tempo inicial e controles. Apenas o controle do tempo 240 horas não apresentou este padrão (Figura 31).

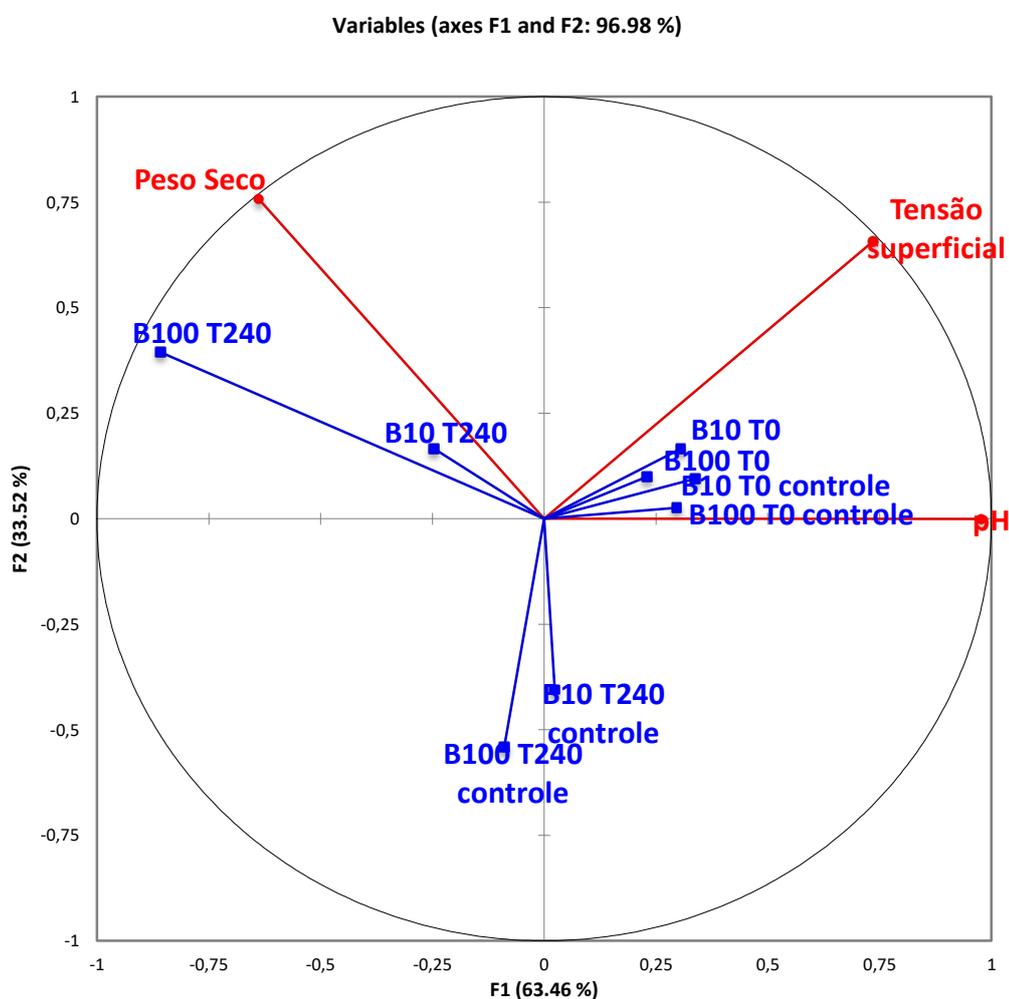


Figura 31. Escores e pesos da análise por componentes principais de pH, peso seco, tensão superficial e amostras B10 e B100 em 0 e 240 horas. Azul: variáveis suplementares. Vermelho: variáveis ativas

### 5.3.3 Fase oleosa

#### 5.3.3.1 Espectroscopia de infravermelho

Foram analisados os espectros gerados por espectroscopia de infravermelho das amostras de tratamento, assim como de controles, dos tempos 0, 48, 96, 168 e 240 horas de ambos combustíveis. As bandas da região 4000 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao combustível B10 estão demonstradas na Figura 32. A Figura 33, onde foi avaliada a região espectral de 1500 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , é referente ao combustível B100.

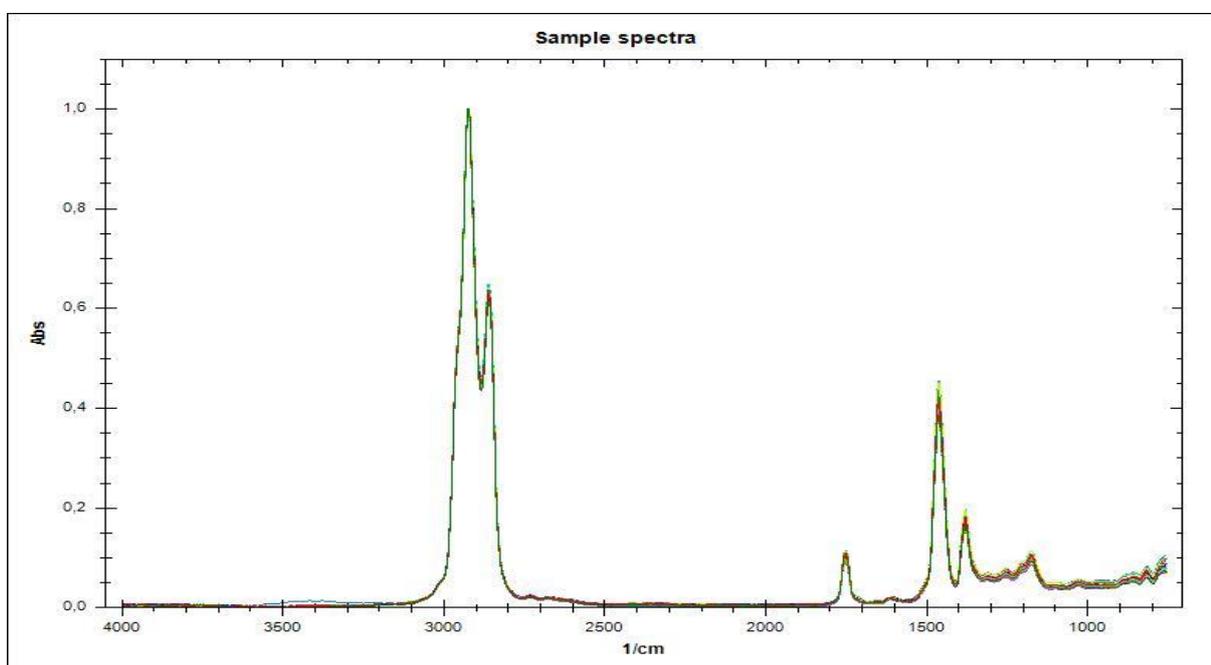


Figura 32. Espectro de infravermelho de combustível B10 das amostras de tratamento, controle e tempo inicial.

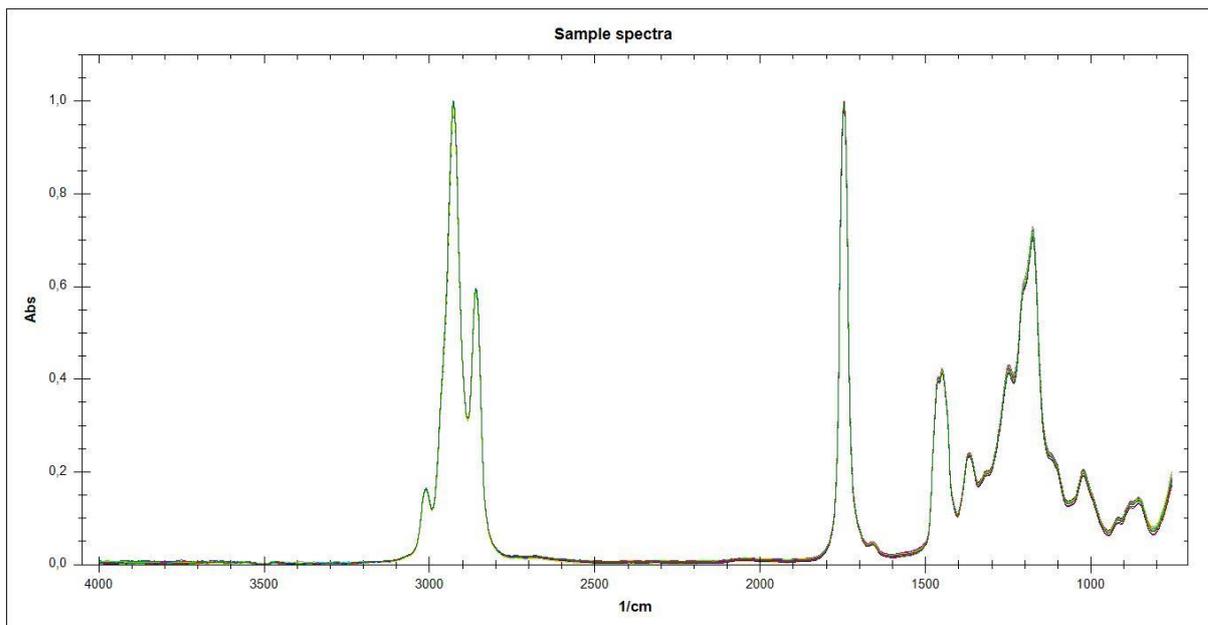


Figura 33. Espectro de infravermelho de combustível B100 das amostras de tratamento, controle e tempo inicial.

Pela PCA das amostras de B10, podemos observar que com duas componentes principais foi possível explicar 92,53% da variância dos dados (Figura 34). Na PC1 as amostras do tempo 48 e 96 horas apresentaram escores positivos e as amostras do tempo 168 e 240 horas, escores negativos. Avaliando a PC1, a degradação ocorrida preferencialmente foi a abiótica, pois os gráficos de pesos indicaram que houve alteração na região da insaturação dos grupos metil esterés presentes no biodiesel e seu pico correspondente diminuiu de acordo com o tempo. Por outro lado, PC2 separou as amostras controle com escores negativos das amostras inoculadas. Com base nesse resultado supõe-se que a degradação ocorrida pelo microorganismo foi pequena, pois os gráficos de pesos da PC2 mostraram que as amostras controle preservaram o grupo carbonila em relação às amostras inoculadas.

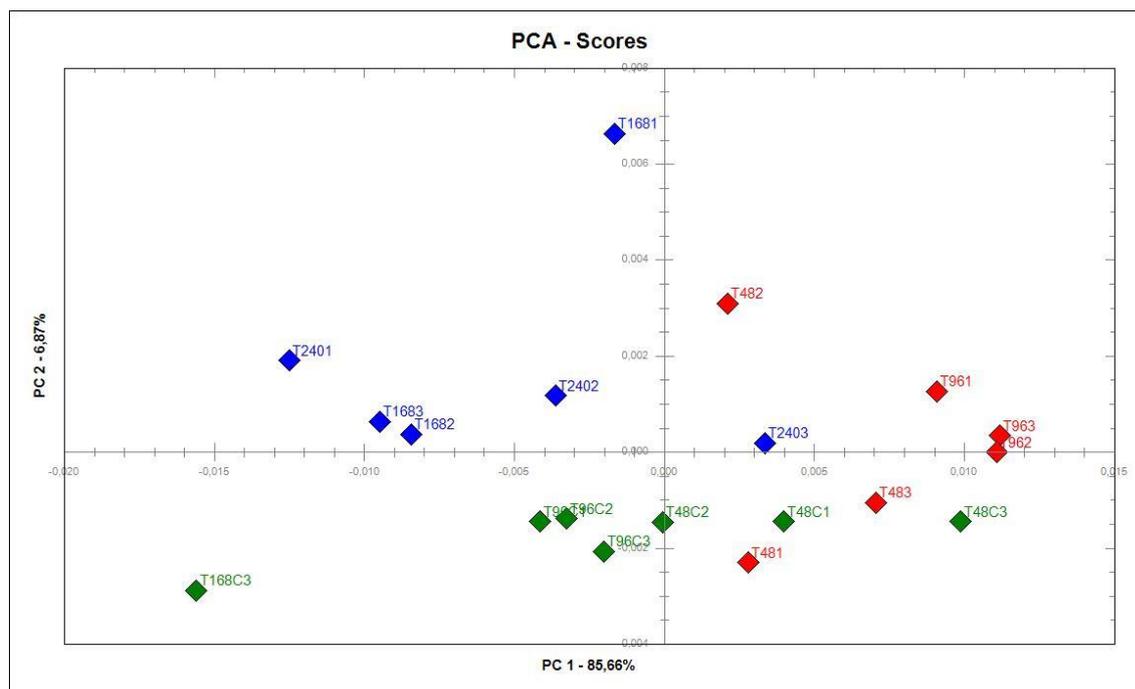


Figura 34. Escores de PCA das análises de B10 das amostras de tratamento e controle.

Pela análise de componentes principais (PCA) das amostras de B100, podemos observar que com duas componentes principais foi possível explicar 77,48% da variância dos dados (Figura 35). Na PC1 as amostras foram separadas de acordo com o tempo. Os gráficos de pesos indicaram que houve uma pequena alteração na região do grupo éster. As amostras dos tempos 0, 48, 96, 168 e 240 horas foram agrupadas, representando uma tendência desta mudança, à medida do passar das horas.

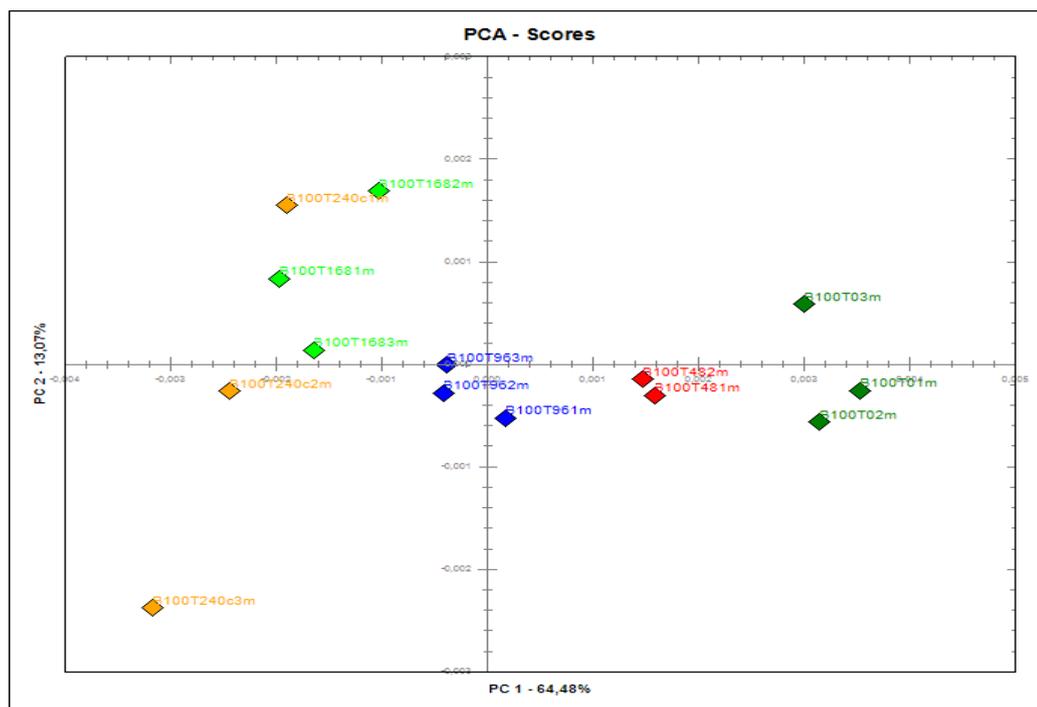


Figura 35. Escores de PCA das análises de B100 das amostras de tratamento e tempo inicial.

#### 5.3.4 Detecção de genes

Foi possível, com a técnica de PCR, observar a amplificação de um fragmento de DNA referente ao gene relacionado ao Citocromo P450 da levedura *Meyerozyma guilliermondii*. Após a visualização do gel de agarose em transluminador, foi detectada a presença do gene durante o crescimento em meio GYMP (Figura 36).

A detecção do gene de triacilglicerol lipase informa sobre a capacidade do fungo em produzir tal enzima, responsável pela degradação dos ésteres de ácido graxo do biodiesel. Com a reação de PCR, foi amplificada mais de uma banda de DNA. Dentre estas bandas, observamos o tamanho esperado de 100 pb referente à região da triacilglicerol lipase. Como os oligonucleotídeos iniciadores são degenerados, algumas bases anelaream-se a mais de uma sequência do genoma da levedura, gerando vários fragmentos de DNA (Figura 37).

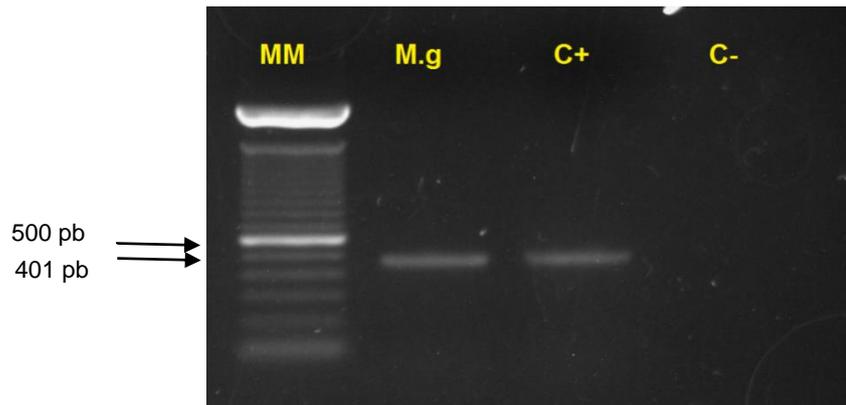


Figura 36. Detecção do gene P450 (401 pb) em *M. guilliermondii* após crescimento em caldo GYMP.MM: Marcador molecular (100 pb); M.g: *M. guilliermondii*; C+: controle positivo; C-: Controle negativo.

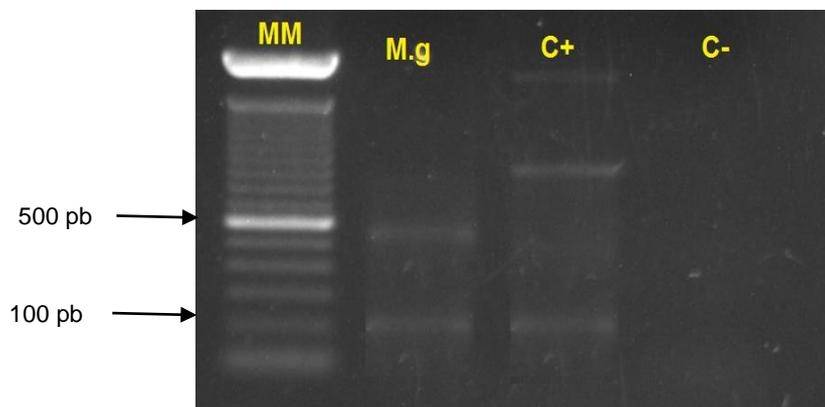


Figura 37. Detecção do gene triacilglicerol lipase (100 pb) em *M. guilliermondii* após crescimento em caldo GYMP.MM: Marcador molecular (100 pb); M.g: *M. guilliermondii*; C+: controle positivo; C-: Controle negativo

## 5.4 DISCUSSÃO

### 5.4.1 Crescimento microbiano

Foi monitorado durante o tempo experimental de 10 dias, o crescimento de *Meyerozyma guilliermondii* em meio mínimo mineral BH contendo B10 ou B100 como fonte de carbono e energia. Foi observado o crescimento da levedura através do aumento celular, monitorado pela UFC mL<sup>-1</sup>, onde constatou-se aumento de quatro logs ao final dos 10 dias.

Em ambas as situações, seja com B100 (biodiesel puro) ou com mistura B10 (biodiesel e diesel), 48 horas foram suficientes para se obter um acréscimo de três logs à curva de crescimento. Comparando os dois combustíveis, não observamos diferença na taxa de crescimento. Portanto, a levedura se mostrou eficiente em metabolizar os ácidos graxos e os hidrocarbonetos.

Estudos anteriores já reportaram o crescimento de leveduras em combustíveis tais como diesel e biodiesel puros e misturas. Bücken *et al.* (2011) avaliaram o comportamento de *Candida silvicola* e *Rhodotorula* sp. em meio mineral e B20 e B100, sendo que ambas espécies demonstraram maior crescimento em B100. Miranda *et al.* (2007) observaram a capacidade de degradação de óleo diesel de *Rhodotorula aurantiaca* e *Candida ernobii* com objetivo de aplicar em biorremediação. Demais pesquisas podem ser encontradas envolvendo fungos deteriogênicos (Bento & Gaylarde, 2001; Bento *et al.*, 2004; Junior *et al.*, 2009).

### 5.4.2 Fase aquosa

Foram observados resultados positivos de produção de lipase pela observação em placas contendo tributirina, sugerindo que a levedura pode utilizar esta enzima na rota de degradação dos ácidos graxos do biodiesel de soja. A partir de 6 horas, foi detectada a produção da enzima. O resultado negativo dos controles, onde não havia inóculo não foi caracterizado pela presença do halo translúcido ao redor da colônia. A metodologia que utiliza a tributirina para detecção de lipase tem sido avaliada em vários estudos de microrganismos com este potencial (Ertugrul *et al.*, 2007; Sirisha *et al.*, 2010; Griebeler *et al.*, 2011).

Com as medidas de pH percebemos pouca variação ao longo das 240 horas, com exceção do tratamento de B100. A constância dos valores pode ser explicada pela concentração de fosfato presente no meio mínimo mineral, mascarando a possível produção de metabólitos ácidos e básicos; ou pelo fato de a levedura não ter sido capaz de produzir tais metabólitos. No entanto, destaca-se o resultado do tempo final de B100, onde houve um decréscimo de pH de 7,2 para 3,48 e podemos supor que houve grande produção de metabólitos ácidos.

A realização da cromatografia gasosa e amostragem por microextração em fase sólida permitiu detectar na fase aquosa do experimento diferentes compostos oriundos da degradação do diesel e biodiesel. Entre estes compostos, foram identificados diversos ácidos carboxílicos. Os ácidos presentes no meio aquoso podem estar envolvidos na diminuição do pH no tempo final de incubação dos tratamentos contendo B100. Esta metodologia pode ser encontrada em estudos anteriores dando ênfase na utilização para avaliar a composição ou degradação de óleos (Gieg *et al.*, 2010; Aktas *et al.*, 2010, 2013).

As medidas de tensão superficial indicam se o microrganismo foi ou não apto a produzir biossurfactante. As medidas finais da fase aquosa apresentaram valores menores que as iniciais, entretanto não houve diferença significativa entre os tratamentos e controles. Podemos atribuir estes resultados à propriedade intrínseca do biodiesel em reduzir a tensão superficial da fase aquosa devido aos ésteres de ácidos graxos semelhantes, estruturalmente, aos biossurfactantes (Meyer, 2011; Bucker, 2011; Souza, 2012; Bucker, 2015).

Os tratamentos contendo B10 e B100 apresentaram resultados semelhantes. Ao longo do tempo de incubação, este efeito, juntamente com a possível ação de biossurfactante proveniente da levedura, implicaram na redução dos valores de tensão superficial. Assim, os compostos dos combustíveis se tornaram mais biodisponíveis para a metabolização do microrganismo.

Observando as medidas de hidrofobicidade celular, ambas amostras de tratamento mostraram alto percentual. A avaliação da hidrofobicidade permite, de forma indireta, avaliar a degradação de um contaminante orgânico hidrofóbico e a capacidade do microrganismo em produzir biossurfactante, à medida que aquela aumenta. Esta pode ser uma via que facilitou a metabolização do diesel e/ou biodiesel pela levedura e facilitou seu crescimento.

Uma pesquisa envolvendo seis espécies de *Candida*, entre elas *guilliermondii*, cultivadas em substratos solúveis e insolúveis estudou hidrofobicidade celular, atividade emulsificante, tensão superficial e interfacial das cepas (Coimbra *et al.*, 2009). Ao contrário dos nossos dados obtidos no atual experimento, a pesquisa não mostrou resultados significantes com *Candida guilliermondii*. Este fato indica que na presença de biodiesel e diesel esta espécie desenvolve um bom desempenho e que diferentes cepas podem não apresentar os mesmos resultados. Obuekwe *et al.* (2009), Cerqueira (2011) e Gorna *et al.* (2011) publicaram informações referentes às medidas de hidrofobicidade celular e biodegradação de diferentes compostos apolares.

O índice de emulsificação (IE<sub>24</sub>) indicou a propriedade de produção de bioemulsificantes pela levedura. No tempo 72 horas do experimento, a fase aquosa com células que esteve em contato com B10 manteve a emulsificação após 24 horas de repouso. Na fase aquosa com B100, foi medida a emulsão apenas na presença de células no tempo final. Com isso, verificamos que o emulsificante pode estar ligado à parede celular da levedura.

Foram detectados resultados positivos no estudo de Souza (2012) ao realizar o protocolo de IE<sub>24</sub>. Isolados de *P. aeruginosa* em blendas de biodiesel e diesel apresentaram diferentes percentuais de emulsão entre a fase oleosa e aquosa. Demais pesquisas indicam que os bioemulsificantes, ao emulsificar, promovem a solubilização dos hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, o que facilita o crescimento dos microrganismos nestes substratos (Desai & Banat, 1997; Banat *et al.*, 2004; Mulligan, 2005; Singh *et al.*, 2007).

Com a análise dos componentes principais, verificamos menores valores de pH e tensão superficial no tempo 240 horas de experimento. Possivelmente, os resultados de pH devem-se à produção de metabólitos ácidos a partir da levedura ou por oxidação do combustível. A redução da tensão superficial pode ser explicada pela produção de biossurfactantes ou pela característica intrínseca do biodiesel em assemelhar-se com esta substância.

#### 5.4.3 Fase oleosa

Os resultados da mistura B10, por PCA gerado a partir de espectroscopia de infravermelho, indicam a provável degradação abiótica nos primeiros dias de

incubação. Pelo fato da diminuição do pico de insaturação ao longo do tempo, provavelmente, nas primeiras horas a fração biodiesel da mistura foi degradada por fatores como oxidação ou hidrólise e não por ação microbiana (Strömber *et al.*, 2013; Yaakob *et al.*, 2014). Os microrganismos, preferencialmente, atacam as porções em que se encontram ligações simples no biodiesel ou metabolizam os carbonos que já encontram-se disponíveis na fase aquosa (Khoury *et al.*, 2011). Comparando os controles com os tratamentos, infere-se que houve uma pequena degradação do grupo carbonila nas amostras com levedura, apesar de a curva de crescimento apresentar grande aumento na contagem de UFC.

Com os resultados de PCA de B100, foi possível visualizar que a região do grupo éster apresentou pouca alteração. Entretanto, conseguiu-se observar uma tendência, separando-se em grupos para cada tempo de incubação das amostras de tratamento. Os resultados obtidos por espectroscopia de infravermelho não mostraram degradação dos combustíveis tão evidente quanto em estudos anteriores na área (Zimmer *et al.*, 2013; Bücker, 2015; De Azambuja *et al.*, 2017).

#### 5.4.4 Detecção de genes

O entendimento da fisiologia de degradação pode iniciar pelo conhecimento da presença de genes funcionais, tais como aqueles responsáveis por enzimas específicas. Partindo da informação de que o microrganismo possua um gene de degradação, pode-se avaliar a expressão e quantificação desse gene em uma curva de crescimento (Cyplik *et al.*, 2011; Sørensen *et al.*, 2011; Martin-Sanchez *et al.*, 2016; 2016). Com a detecção do gene de Citocromo P450 em *Meyerozyma guilliermondii*, um fungo reportado como degradador de diesel, enfatiza a rota de monoxigenases secretadas pelos microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos e facilitar a metabolização dos carbonos. A detecção do gene de triacilglicerol lipase contribui para o entendimento das rotas usadas para degradação dos ácidos graxos pelo microrganismo.

## 5.5 CONCLUSÃO

A levedura *Meyerozyma guilliermondii* cresceu com B10 e B100 como fontes de carbono em meio mínimo mineral, sendo que foi observado aumento de 4 logs de UFC mL<sup>-1</sup> após 10 dias de incubação. Não foi observada diferença significativa no crescimento da levedura entre B10 e B100. Pela análise de infravermelho, verificou-se que não houve degradação representativa do biodiesel. Analisando a porção biodiesel na blenda B10 e de B100, ocorreu pequena alteração no grupo éster.

A levedura não mostrou-se eficiente produtora de biossurfactantes extracelulares ao longo das 240 horas de incubação, pois não produziu compostos capazes de reduzir a tensão superficial. Entretanto, mostrou-se eficiente em produzir bioemulsificantes. Foi detectada a presença do gene de Citocromo P450 relacionado à degradação de alcanos e do gene de lipase relacionado à degradação de ésteres de ácido graxo no genoma da levedura. Os principais compostos identificados na fase aquosa em contato com B10 e B100 com e sem inóculo por cromatografia gasosa e amostragem por microextração em fase sólida foram: alcanos, álcoois, aldeídos, ésteres, ácidos, sulfurados, cetonas e fenóis. Estes compostos são resultado da degradação do diesel e biodiesel e metabólitos produzidos pela levedura.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

Em relação ao crescimento em meio BH e combustível e biocombustível, o fungo filamentosso *Pseudallescheria boydii* foi acompanhado por 45 dias incubado a 28 °C. O tratamento que apresentou maior taxa de crescimento foi o de B10. A levedura *Meyerozyma guilliermondii* foi acompanhada por 10 dias e foi incubada a 30 °C. Apresentou mesma taxa de crescimento nos combustíveis B10 e B100. Portanto, ambos microrganismos foram aptos a utilizar ácidos graxos e hidrocarbonetos como sua fonte de carbono. A produção de lipase foi detectada nos dois experimentos. Este resultado indica a capacidade dos fungos em utilizar a rota metabólica da lipase para degradar ésteres de ácidos graxos do biodiesel.

Com as medidas de pH não foi observada redução significativa no experimento com *P. boydii* ao longo dos 45 dias. Os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Em *M. guilliermondii* houve pouca variação. Apenas o tratamento com B100 em 240 horas apresentou redução significativa do pH. Em ambos experimentos foi utilizado meio BH que apresenta efeito tamponante pelo fosfato. Este dado justifica a constância dos resultados. Pela cromatografia gasosa foram detectados compostos na fase aquosa que indicam a degradação do diesel e do biodiesel e a produção de metabólitos ácidos pelos microrganismos.

Com as medidas de tensão superficial foi possível averiguar que os fungos não produziram biossurfactantes. Os tratamentos não diferenciaram dos controles. Nas análises com biodiesel puro ou na mistura o resultado obtido foi de maior redução da tensão superficial, tanto em tratamento quanto controle, indicando que os ésteres do biodiesel se assemelham à composição dos biossurfactantes. A emulsão dos combustíveis analisada pelo índice de emulsificação, foi detectada apenas em *M. guilliermondii*. O resultado positivo foi observado em B10 na presença de células. Desta forma, o emulsificante pode estar ligado à parede celular da levedura.

Com a análise de espectroscopia por infravermelho das amostras de *P. boydii* foi observada a diminuição do pico da função carbonila e surgimento de um pico secundário nas amostras de B10 e B100. Nas amostras de *M. guilliermondii*, constatou-se degradação abiótica em B10 e pequena degradação da função carbonila em tratamento e controle. Em B100 apresentou pouca alteração do grupo éster. A

metodologia utilizada poderia ser complementada com técnicas para explorar outros grupamentos funcionais dos combustíveis.

Foi detectada a presença dos genes referentes à carboxilesterase e citocromo P450 (monoxigenase) no genoma de *P. boydii* e triacilglicerol lipase e citocromo P450 no genoma de *M. guilliermondii*. Portanto, são sugeridas as rotas metabólicas utilizadas pelos fungos para degradação de hidrocarbonetos e ésteres por tais enzimas.

## 7. CONCLUSÃO GERAL

O fungo filamentoso *Pseudallescheria boydii* e a levedura *Meyerozyma guilliermondii* utilizaram biodiesel e a mistura B10 de diesel e biodiesel como fonte de carbono para seu crescimento. No entanto, foi observado maior crescimento (biomassa) para o *P. boydii* com biodiesel. Em relação a biossurfactantes, ambos os fungos não foram eficientes produtores. Entretanto, a levedura mostrou-se eficiente em produzir bioemulsificantes.

A análise de cromatografia gasosa foi capaz de detectar os metabólitos produzidos pelos fungos e compostos provenientes da degradação dos combustíveis. Foi observada para *P. boydii*, degradação do biodiesel puro e da mistura B10 pela técnica de infravermelho e para hidrocarbonetos por RMN. No entanto, para *M. guilliermondii*, não foi observada degradação significativa do biodiesel. Foram detectados genes funcionais tais como o gene P450 e o da lipase, relacionados à degradação de alcanos e ésteres, respectivamente.

## 8 REFERÊNCIAS

### Artigos:

- Ahmed EF, Hassan, SS. 2013. Antimicrobial activity of a bioemulsifier produced by *Serratia marcescens* S10. *J. AL-Nahrain Univ.* 16:147–155.
- Alves JCL, Poppi, RJ. 2016. Quantification of conventional and advanced biofuels contents in diesel fuel blends using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Fuel.* 165:379-388
- Andrade DF, Mazzei JL, Kaiser CR, d'Avila L A. 2012. Assessment of different measurement methods using <sup>1</sup>H-NMR data for the analysis of the transesterification of vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(4): 619-630.
- Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis - ANP (BRASIL). Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2014. Rio de Janeiro: ANP.
- Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis - ANP (BRASIL). Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2016. Rio de Janeiro: ANP. 265
- Aktas DF, Lee JS, Little BJ, Ray RI, Davidova IA, Lyles CN, Suflita JM. 2010. Anaerobic metabolism of biodiesel and its impact on metal corrosion. *Energy & Fuels.* 24(5):2924-2928.
- Aktas DF, Lee JS, Little BJ, Duncan KE, Perez-Ibarra BM, Suflita JM. 2013. Effects of oxygen on biodegradation of fuels in a corroding environment. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 81:114-126.
- Allsopp DSK, Seal KJ, Gaylarde CC, Bento FM, Shirakawa M. 2016. Cap 3 American Society for Testing Materials ASTM D4176-04. 2014. Standard Test Methods for Free Water Particulate Contamination in Distillate Fuels (Visual Inspection Procedures), ASTM International, West Conshohocken, PA.
- April TM, Abbott SP, Foght JM, Currah RS. 1998. Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microasaceae). *Canadian journal of microbiology.* 44(3):270-278.
- Atadashi I, Aroua M, Aziz AA. 2010. High quality biodiesel and its diesel engine application: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 14:1999-2008.
- Ayed HB, Jemil N, Maalej H, Bayouhd A, Hmidet N, Nasri M. 2015. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* AN6. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99:8-14.
- Babu AG, Kim SW, Yadhav DR, Adhikari M, Kim C, Lee HB, Lee YS. 2014. A New Record of *Pseudallescheria boydii* Isolated from Crop Field Soil in Korea. *Mycobiology.* 42(4):397-400.
- Bakanaukas S. 1958. Bacterial activity in JP-4 fuel. Wright air development centre technical report 58, 44, armed. Services Technical Information Agency Document N°151055. 1-15.
- Banat IM, Marchant R, Rahman TJ. 2004. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel

- obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54:2197-2201.
- Batts BD, Fathoni ZA. 1991. A literature Review on fuel stability studies with particular emphasis on diesel oil. *Energy & Fuels*. 5:2-21.
- Beker SA, Silva YP, Bücke F, Cazarolli JC, Quadros PD, Peralba MCR, Piatnicki CMS, Bento FM. 2016. Effect of different concentrations of tert-butylhydroquinone (tbhq) on microbial growth and chemical stability of soybean biodiesel during simulated storage. *Fuel*. 84:701-707.
- Bell PJ, Sunna A, Gibbs MD, Curach NC, Nevalainen H, Bergquist PL. 2002. Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology*. 148(8):2283-2291.
- Bento FM, Gaylarde CC. 2001. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. Barking. 47:107-112.
- Bento FM, Englert GE, Gaylarde CC, Muller IL. 2004. Influence of aqueous phase on electrochemical biocorrosion tests in diesel/water systems. *Materials and Corrosion*. 55:577-585.
- Bento FM. 2005. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21(2):135-142.
- Bento FM, Viscardi LC, Daroda R, Menedez AG, Gaylarde CC, Camargo FAO. 2006. Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel a contaminação microbiana durante a estocagem. *Revista Biodiesel*. 4:24-26.
- Bento FM, Bücke F, Santestevan N, Cavalcanti EHS, Zimmer A, Gaylarde C, Camargo F. 2010. Impacto da adição do biodiesel ao óleo diesel durante a estocagem: Um enfoque microbiológico e controle. *Revista Biodiesel*, 47; Caderno técnico.
- Betha R, Balasubramanian R, Engling G. 2013. Physico-chemical characteristics of particulate emissions from diesel engines fuelled with waste cooking oil derived biodiesel and ultra low sulphur diesel. P.Z. Fang (Ed.), *Biodiesel – Feedstocks Production and Applications*.
- Bergmann JC, Tupinamba DD, Costa OYA, Almeida JRM, Barreto CC, Quirino BF. 2013. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 21:411-420.
- Bilal VI, Kowal EZ. 1980. The Growth of Fungi on Oil Hydrocarbons.
- Bognolo, G. 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 152(1):41-52.
- Borzani W, Hiss H. 1984. Kinetics of nitrogen consumption during the batch growth of *Candida guilliermondii* on diesel oil and on molasses. *Biotechnology Letters*, 6(8):511-516.
- Bücke F, Santestevan NA, Roesch LF, Jacques RJS, Peralba MCR, Camargo FAO, Bento FM. 2011. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65:172-178.
- Bushnell LD, Haas HFI. 1941. The utilization of hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.* 41.
- Cai M, Jiménez N, Krüger M, Guo H, Jun Y, Straaten N, Richnow HH. 2015.

- Potential for aerobic and methanogenic oil biodegradation in a water flooded oil field (Dagang oil field). *Fuel*. 141:143-153.
- Callaghan AV. 2013. Metabolomic investigations of anaerobic hydrocarbon-impacted environments. *Current opinion in biotechnology*. 24(3):506-515.
- Campos JM, Stamford TLM, Sarubbo LA. 2014. Production of a bioemulsifier with potential application in the food industry. *Appl. Biochem. Biotech.* 172:3234–3252
- Cardenas F, Alvarez E, de Castro-Alvarez MS, Sanchez-Montero JM, Valmaseda M, Elson SW, Sinisterra JV. 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 14(4):111-123.
- Carrasco, M., Rozas, J. M., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2012). Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC microbiology*, 12(1), 1.
- Castilho-Almeida EW, Dos Santos HF, de Miranda AM, Jorio A, Ferreira, EHM, Achete CA, De Almeida WB. 2012. Estudo teórico e experimental de espectros infravermelho de ésteres de ácido graxo presentes na composição do biodiesel de soja. *Quim. Nova*, 35(9):1752-1757.
- Cavalcanti EHS. 2009. Estabilidade do Biodiesel e misturas – Abrangência, limitações dos métodos de avaliação e alternativas futuras. *BiodieselBR*. Curitiba. 71-73.
- Cazarolli JC, Bücker F, Manique MC, Krause LC, Maciel GPDS, Onorevoli B, Bento FM. 2012. Suscetibilidade do biodiesel de sebo bovino à biodegradação por *Pseudallescheria boydii*. *Revista Brasileira de Biociências*. 10(3):251-257.
- Cazarolli JC, Guzatto R, Samios D, Peralba MDCR, de Siqueira Cavalcanti EH, Bento FM. 2014. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 95:364-372.
- Chuck CJ, Bannister CB, Jenkins RW, Lowe JP, Davidson MG. 2012. A comparison of analytical techniques and the products formed during the decomposition of biodiesel under accelerated conditions. *Fuel*. 96:426-433.
- Chung YC, Chen HC, Shyu YT, JHUA. 2000. Temperature and water effects on the biodeterioration for marine fuel oil. *Fuel*, 79(12):1525-1532.
- Claußen M, Schmidt S. 1998. Biodegradation of phenol and p-cresol by the hyphomycete *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol*, 149:399-406.
- Claußen M, Schmidt S. 1999. Biodegradation of phenylbenzoate and some of its derivatives by *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol*. 150:413-420
- Claxton LD. 2015. The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions. Part 3: diesel and gasoline. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 763:30-85.
- Coimbra CD, Rufino RD, Luna JM, Sarubbo LA. 2009. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. *Current microbiology*. 58(3):245-251.
- Cooper DG, Goldenberg BG. 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, Quebec. 53(2):224- 229.
- Covino S, D'Annibale A, Stazi SR, Cajthaml T, Čvančarová M, Stella T, Petruccioli

- M. 2015. Assessment of degradation potential of aliphatic hydrocarbons by autochthonous filamentous fungi from a historically polluted clay soil. *Science of the Total Environment*. 505:545-554.
- Črešnar B, Petrič Š. 2011. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1814(1):29-35.
- Cyplik P, Schmidt M, Szulc A, Marecik R, Lisecki P, Heipieper HJ, Chrzanowski Ł. 2011. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. *Bioresource technology*. 102(6):4347-4352.
- D'Agosto MA. 2015. Evaluating the potential of the use of biodiesel for power generation in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 43:807-817.
- Das N, Chandran P. 2010. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*. 2011.
- De Azambuja AO, Bücker F, de Quadros PD, Zhalnina K, Dias R, Vacaro BB, Bento FM. 2017. Microbial community composition in Brazilian stored diesel fuel of varying sulfur content, using high-throughput sequencing. *Fuel*. 189:340-349.
- De Castro HF, Mendes AA, dos Santos JC, de Aguiar CL. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*. 27(1):146-156.
- De França FP, Vieira DM, de Siqueira Cavalcanti EH. 2009. Biodegradation of soy biodiesel by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pichia guilliermondii*. *Canadian Journal of Pure and Applied Sciences*, 1355
- DeMello A. 2007. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. *Marine Pollution Bulletin*, Oxford. 54(7):894-904.
- Desai JD, Banat IM. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington. 61(1):47-64.
- De Souza VHA, Dos Santos LT, Campos AF, Carolino J. 2016. Um panorama do biodiesel no brasil e no mundo: esforços para a ampliação do setor e desafios. *Ver. Augustus*. 21(41):117-130.
- Domingos AK, Vecchiatto W, Wilhelm HM, Ramos LP. 2007. Effect of synthetic antioxidants of the oxidation stability of soybean oil ethyl esters. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 18:416-423.
- Dupont J, Suarez PAZ, Meneghetti SMP. 2009. Catalytic production of biodiesel and diesel-like hydrocarbons from triglycerides. *Energy Environ. Sci*. 2:1258-1265.
- Durairaj P, Hur JS, Yun H. 2016. Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microbial Cell Factories*. 15(1):125.
- Eirich LD, Craft DL, Steinberg L, Asif A, Eschenfeldt WH, Stols L, Donnelly MI & Wilson CR. 2004. Cloning and characterization of three fatty alcohol oxidase genes from *Candida tropicalis* strain ATCC 20336. *Appl Environ. Microb*. 70:4872-4879.
- Ertuğrul S, Dönmez G, Takaç S. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*. 149(3):720-724.
- Ferrari RA, Oliveria VS, Scabio OA. 2005. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de

- energia. *Química Nova*. 28(1):19-23.
- Flores IS, Godinho MS, De Oliveira AE, Alcantara GB, Monteiro MR, Menezes S MC, Lião LM. 2012. Discrimination of biodiesel blends with <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and principal component analyses. *Fuel*.99:40-44.
- Fontes GC, Amaral PFF, Coelho MAZ. 2008. Biosurfactants production by yeasts. *Química Nova*. 31(8):2091-2099.
- Fregolente PBL, Fregolente LV, Wolf Maciel MR. 2012. Water content in biodiesel, diesel, and biodiesel–diesel blends. *Journal of chemical & engineering data*. 57(6):1817-1821.
- Furlan PY, Wetzel P, Johnson S, Wedin J, Och A. 2010. Investigating the oxidation of biodiesel from used vegetable oil by FTIR spectroscopy: used vegetable oil biodiesel oxidation study by FTIR. *Spectr Lett*. 43:580.
- Gaylarde CC, Bento FM, Kelley J. 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Revista de Microbiologia, Rio de Janeiro*. 30:1-10.
- Gieg LM, Davidova IA, Duncan KE, Suflita JM. 2010. Methanogenesis, sulfate reduction and crude oil biodegradation in hot Alaskan oilfields. *Environmental Microbiology*. 12(11):3074-3086.
- Godoy MG, Gutarra MLE, Maciel FM, Felix SP, Bevilaqua JV, Machado OLT, Freire DMG. 2009. Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. *Enzyme and Microbial Technology*. 44:317-322.
- Gopinath SCB, Anbu P, Hilda A. 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*.46:119–126.
- Gopinath SC, Anbu P, Lakshmi priya T, Hilda A. 2013. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed research international*.
- Gorna H, Lawniczak L, Zgola-Grzeskowiak A, Kaczorek E. 2011. Differences and dynamic changes in the cell surface properties of three *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum-polluted soil as a response to various carbon sources and the external addition of rhamnolipids, *Bioresource Technology, Polônia*. 102(3):3028–3033.
- Goulart GG, Coutinho JOPA, Monteiro AS, Siqueira EP, Santos VL. 2014. Isolation and Characterization of Gasoline-Degrading Yeasts from Refined Oil-Contaminated Residues. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 5(2):1.
- Griebeler N, Polloni AE, Remonato D, Arbter F, Vardanega R, Cechet JL, Rigo E. 2011. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food and Bioprocess Technology*. 4(4):578-586.
- Grundmann R, Rehm HJ. 1991. Biodegradation of diesel-fuel: use of free and immobilized mixed cultures in soils. *Erdöl und Kohle, Erdgas, Petrochemie vereinigt mit Brennstoff-Chemie*, 44(4):149-150
- Gunasekaran V, Donmez E, Girhard M, Urlacher VB, Constantí M. 2014. Biodegradation of fuel oxygenates and their effect on the expression of a newly identified cytochrome P450 gene in *Achromobacter xylosoxidans* MCM2/2/1. *Process Biochemistry*. 49(1):124-129.
- Gutheil NG. 1966. Ocorrência de *Cladosporium resinae* (Lindau) de Vries em querosene de aviação no Brasil. *Boletim No. 9, Instituto Tecnológico do RS*.
- Hill EC, Hill GC. 2009. Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesel. In IASH, 2009, The 11<sup>th</sup>

- International Conference of Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Prague, Czech Republic, October.
- Hiss H, Finguerut J, Borzani W. 1977. The Influence of pH on the Growth of *Candida guilliermondii* in Media Containing Diesel Oil as the Main Carbon Source. *Journal of fermentation technology*, 55(4):405-408.
- Horel A, Schiewer S. 2011. Influence of constant and fluctuating temperature on biodegradation rates of fish biodiesel blends contaminating Aaskan sand. *Chemosphere*, 83:652—660.
- Hoshino V, Iwata V, Koseki H. 2007. Oxidation, Stability and Risk Evaluation of Biodiesel. *Thermal Science*. 11(2):87-100.
- Iida T, Sumita T, Ohta A, Takagi M. 2000. The cytochrome P450ALKmultigene family of an n-alkane-assimilating yeast, *Yarrowialipolytica*: cloning and characterization of genes coding for newCYP52 family members. *Yeast* 16:1077–1087.
- Imdadul HK et al. 2015. Comprehensive review on the assessment of fuel additive effects on combustion behavior in ci engine fuelled with diesel and biodiesel blends. *RSC advances*. 5(83):67541-67567.
- Jain S, Sharma MP. 2010. Stability of biodiesel and its blends: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14(2):667—678.
- Jakeria MR, Fazal MA, Hasseb ASMA. 2014. Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Review*. 30:154-163.
- Janda-Ulfig K, Ulfig, K, Cano J, Guarro J. 2008. A study of the of *Pseudallescheria boydii* isolates from sewage sludge and clinical sources on tributyrin, rapeseed oil, biodiesel Oil and diesel oil. *Ann Agric Environ Med*. 15:45—49.
- Johnsen AR, Wickb LY, Harms H. 2015. Principles of microbial PAH- degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133:71-84.
- Junior JS, Mariano AP, Angelis DF. 2009. Biodegradation of biodiesel/ diesel blends by *Candida viswanathii*. *African Journal of Biotechnology*. 8:2774-2778
- Käppeli O. 1986. Cytochromes P-450 of yeasts. *Microbiological reviews*. 50(3):244.
- Karimi M, Hassanshahian M. 2016. Isolation and characterization of phenol degrading yeasts from wastewater in the coking plant of Zarand, Kerman. *brazilian journal of microbiology*. 47(1):18-24.
- Kauppi S, Sinkkonen A, Romantschuk M. 2011. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 6:359-368.
- Khoury RR, Ebrahimi D, Hejazi L, Bucknall MP, Pickford R, Hibbert DB. 2011. Degradation of fatty acid methyl esters in biodiesels exposed to sunlight and seawater. *Fuel*. 90(8):2677-2683.
- Klinksporn N. 2009. Impact of Biodeterioration on on diesel Fuel system. In: IASH 2009, The 11<sup>th</sup> International Conference of Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Prague, Czech Republic, October.
- Knothe G, 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*. 86:1059-1070.
- Knothe G. 2010. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*. 36(3):364—373.

- Ko WH, Tsou YJ, Ju YM, Hsieh HM, Ann PJ. 2010. Production of a fungistatic substance by *Pseudallescheria boydii* isolated from soil amended with vegetable tissues and its significance. *Mycopathologia*. 169(2):125-131.
- Kraková L, Pangallo D, Piecková E, Majorošová M. 2016. Discriminative potential of some PCR-based and biochemical methods at *Scedosporium* strains. *Fungal biology*. 120(2):155-161.
- Kumar M, Ghosh P, Khosla K, Thakur IS. 2016. Biodiesel production from municipal secondary sludge. *Bioresource technology* 216:165-171.
- Laviola BG. 2014. Desempenho agrônômico e ganho genético pela seleção de Pinhão manso em três regiões do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 49(5):356-363.
- Lee JS, Ray RI, Little BJ. An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. *Biofouling*. 26(6):623-635.
- Liu PWG, Chang TC, Chen CH, Wang MZ, Hsu HW. 2014. Bioaugmentation efficiency investigation on soil organic matters and microbial community shift of diesel-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95:276-284.
- Lôbo IP, Ferreira SLC, Cruz DA. 2009. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quim. Nova*, 32:1596—1608.
- Lutterbach MTS, Galvão M. 2014. Application of the qPCR Technique for SRB quantification in samples from oil and gas industries.
- Ma C, Liu J, Zhou T, Wang C, Zeng X, Liu Z, Cheng C. 2015. Study on Characteristics of Marine Petroleum-Degrading Strains and Their Bioremediation Utilization of Carbon Source Spectrum. *Journal of Bionanoscience*, 9(2):127-134.
- Mahamuni NN, Adewuyi YG. 2009. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Method To Monitor Soy Biodiesel and Soybean Oil in Transesterification Reactions, Petrodiesel–Biodiesel Blends, and Blend Adulteration with Soy Oil. *Energy & Fuels*. 23:3773-3782.
- Marchal R, Penet S, Solano-Serena F, Vandecasteele JP. 2003. Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil and Gas Science and Technology*. 58(4):441–448.
- Markovetz AY, Cazin I, Allen IE. 1968. Assimilation of alkanes by fungi. *Appl Microbiol*. 16:484-490.
- Martinelle M, Holmquist M, Hult K. 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1258(3): 272-276.
- Martin-Sanchez PM, Gorbushina AA, Kunte HJ, Toepel J. 2016. A novel qPCR protocol for the specific detection and quantification of the fuel-deteriorating fungus *Hormoconis resinae*. *Biofouling*. 32(6):635-644.
- Martin-Sanchez PM, Gorbushina AA, Toepel J. 2016. Quantification of microbial load in diesel storage tanks using culture-and qPCR-based approaches. *International Biodeterioration & Biodegradation*.
- McCormick RL, Westbrook SR. 2009. Storage stability of biodiesel and biodiesel blends. *Energy & Fuels*. 24(1):690-698.
- Miranda RC, Souza CS, Gomes EB, Lovaglio RB, Lopes CE, Sousa MF. 2007. Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape Port

- in the State of Pernambuco e Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology. 50:147-152.
- Monteiro MR, Ambrozini ARP, Lião LM, Ferreira AG. 2009. Determination of biodiesel blend levels in different diesel samples by  $^1\text{H}$  NMR. Fuel. 88(4):691-696
- Monteiro AS, Bonfim MR, Domingues VS, Correa AJr, Siqueira EP, Zani CL. 2010. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. Bioresour. Technol.
- Mulligan CN. 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environmental pollution. 133(2):183-198.
- Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14(2):578-597.
- Nakajima-Kambe T, Edwinoliver NG, Maeda H, Thirunavukarasu K, Gowthaman MK, Masaki K, Kamini NR. 2012. Purification, cloning and expression of an *Aspergillus niger* lipase for degradation of poly (lactic acid) and poly ( $\epsilon$ -caprolactone). Polymer degradation and stability. 97(2):139-144.
- Nguyen LN, Dao TT, Živković T, Fehrholz M, Schäfer W, Salomon S. 2010. Enzymatic properties and expression patterns of five extracellular lipases of *Fusarium graminearum* in vitro. Enzyme and microbial technology. 46(6):479-486.
- Obuekwe CO, Al-Jadi ZK, Al-Saleh ES. 2009. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment, International Biodeterioration & Biodegradation. 63:73–279.
- Oliveira ACD, Fernandes ML, Mariano AB. 2014. Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. Brazilian Journal of Microbiology. 45(4):1503-1511.
- Panjari N, Sachan SG, Sachan A. 2014. Screening of bioemulsifier-producing microorganisms isolated from oil-contaminated sites. Ann. Microbiol.
- Paria S. 2008. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. Advances in Colloid and Interface Science. 138(1):24-58.
- Passman FJ. 2003. Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control, Manual 47. ASTM International, West Conshohocken. 114.
- Passman, FJ. 2013. Int. Biodeterior. Biodegradation. 81:88–104.
- Patel V, Sharma A, Lal R, Al-Dhabi NA, Madamwar D. 2016. Response and resilience of soil microbial communities inhabiting in edible oil stress/contamination from industrial estates. BMC microbiology. 16(1):1.
- Perfumo A, Smyth TJP, Marchant R, Banat IM. 2009. Production and roles of biosurfactant and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids and Derived Compounds. 1502–1512.
- Pi Y, Meng L, Bao M, Sun P, Lu J. 2016. Degradation of crude oil and relationship with bacteria and enzymatic activities in laboratory testing. International Biodeterioration & Biodegradation 106:106-116.
- Poli JS, da Silva MAN, Siqueira EP, Pasa VM, Rosa CA, Valente P. 2014. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: a potential

- feedstock for biodiesel production. *Bioresource technology*. 161: 320-326.
- Portela NA, Oliveira EC, Neto AC, Rodrigues RR, Silva SR, Castro EV, Filgueiras PR. 2016. Quantification of biodiesel in petroleum diesel by  $^1\text{H}$  NMR: Evaluation of univariate and multivariate approaches. *Fuel*.166:12-18.
- Pullen J, Saeed K. 2012. An overview of biodiesel oxidation stability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.16:5924–5950.
- Rainer J, Zacke A, Lackner E, Kaltseis J. 2005. Dynamics in *Pseudallescheriabydii*: patterns and interrelationships of phenomena affecting growth and change within populations. ECMM Working Group on *Pseudallescheria/Scedosporium* Infections, Berlin.
- Rainer J, De Hoog GS. 2006. Molecular taxonomy and ecology of *Pseudallescheria*, *Petriella* and *Scedosporium prolificans* (Microascaceae) containing opportunistic agents on humans. *Mycological research*. 110(2): 151-160.
- Rajasekar A, Babu TG, Maruthamuthu S, Pandian STK, Mohanan S, Palaniswamy N. 2007. Biodegradation and corrosion behavior of *Serratia marcescens* SCE2 isolated from an Indian diesel-transporting pipeline. *Worlds Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(8):1065-1074.
- Rapp P, Backhaus S. 1992. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(11):938-943.
- Reis EFD, et al. 2013. Desempenho e emissões de um motor-gerador ciclo diesel sob diferentes concentrações de biodiesel de soja. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 7:565-571.
- Ribeiro NM, Pinto AC, Quintella CM, Rocha GO, Teixeira LSG, Guarieiro LLN, Rangel MC, Veloso MCC, Rezende MJC, Cruz RS, Oliveira AM, Torres EA, Andrade JB. 2007. The role of additives for diesel and diesel blended (ethanol or biodiesel) Fuels: a Review. *Energy & Fuels*. 21:2433-2445.
- Rodrigues Filho MG, Souza AG, Santos IMG, Bicudo TC, Silva MCD. 2009. Antioxidative properties of hydrogenated cardanol for cotton biodiesel by PDSC and UV/vis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 97:605-609.
- Rodríguez-Rodríguez CE, Rodríguez E, Blanco R, Cordero I, Segura, D. 2010. Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment. *Journal of Environmental Sciences*. 22(10):1595-1601.
- Salvi BL, Panwar NL. 2012. Biodiesel resources and production technologies — A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16(6):3680-3689.
- Sajna KV, Sukumaran RK, Gottumukkala LD, Pandey A. 2015. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresource technology*. 191:133-139.
- Sarrouh BF, de Freitas Branco R, Da Silva SS. 2009. Biotechnological production of xylitol: enhancement of monosaccharide production by post-hydrolysis of dilute acid sugarcane hydrolysate. *Applied biochemistry and biotechnology*. 153(1-3):163-170.
- Sarubbo LA, de Luna JM, Rufino RD, Brasileiro PP. 2016. Production of a Low-cost Biosurfactant for Application in the Remediation of Sea water Contaminated with Petroleum Derivates. *CHEMICAL ENGINEERING*. 49.
- Satpute SK, Banpurkar AG, Dhakephalkar PK, Banat IM, Chopade BA. 2010. Methods of investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit. Rev. Biotechnol*. 30:127–144.
- Schleicher T, Werkmeister R, Russ W, Meyer-Pittroff R. 2009. Microbiological

- stability of biodiesel–diesel-mixtures. *Bioresource Technology*. 100(2):724-730.
- Seghezzi W, Sanglard D, Fiechter A. 1991. Characterization of a second alkane-inducible cytochrome P450-encoding gene, CYP52A2, from *Candida tropicalis*. *Gene*. 106(1):51-60.
- Sekhon-Randhawa KK. 2014. Biosurfactants produced by genetically manipulated microorganisms: challenges and opportunities. *Biosurfactants*, eds N. Kosaric and F.V. Sukan. 49–67.
- Silva MAA, Correa RA, Tavares MGO, Filho NRA. 2015. A new spectrophotometric method for determination of biodiesel content in biodiesel/diesel blends. *Fuel*. 143:16-20
- Singh AK, Mukhopadhyay M. 2012. Overview of fungal lipase: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*. 166(2):486-520.
- Singh A, Van Hamme JD, Ward OP. 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, Oxford. 25(1):99-121.
- Sirisha E, Rajasekar N, Narasu ML. 2010. Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Advances in Biological Research*. 4(5):249-252.
- Sitohy MZ, Rashad MM, Sharobeem SF, Mahmoud AE, Nooman MU, Al Kashef AS. 2010. Bioconversion of soy processing waste for production of surfactants. *African Journal of Microbiology Research*. 4(24):2811-2821.
- Souza MM, Colla TS, Bucker F, Ferrão MF, Te Huang C, Andreazza R, Bento FM. 2016. Biodegradation potential of *Serratia marcescens* for diesel/biodiesel blends. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 110:141-146.
- Sorate KA, Bhale PV. 2015. Biodiesel properties and automotive system compatibility issues. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 41(0):777–798.
- Sørensen G, Pedersen DV, Nørgaard AK, Sørensen KB, Nygaard SD. 2011. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresource technology*. 102(8):5259-5264.
- Soriano AU, Martins LF, de Assumpção Ventura ES, de Landa FHTG, de Araújo Valoni E, Faria FRD, do Carmo FL, Peixoto. 2015. Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 99:102-114.
- Srivastava A, Prasad R. 2000. Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 4:111–33.
- Strömberg N, Saramat A, Eriksson H. 2013. Biodiesel degradation rate after refueling. *Fuel*. 105:301-305.
- Sugihara A, Senoo T, Enoki A, Shimada Y, Nagao T, Tominaga Y. 1995. Purification and characterization of a lipase from *Pichia burtonii*. *Applied microbiology and biotechnology*. 43(2):277-281.
- Syed K, Doddapaneni H, Subramanian V, Lam YW, Yadav JS. 2010. Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biochemical and biophysical research communications*. 399(4):492-497.
- Tariq M, Ali S, Ahmad F, Ahmad M, Zafar M, Khalid N, Khan MA. 2011. Identification, FT-IR, NMR (1 H and 13 C) and GC/MS studies of fatty acid methyl esters in biodiesel from rocket seed oil. *Fuel Processing*

- Technology. 92(3):336-341.
- Toida J, Fukuzawa M, Kobayashi G, Ito K, Sekiguchi J. 2000. Cloning and sequencing of the triacylglycerol lipase gene of *Aspergillus oryzae* and its expression in *Escherichia coli*. FEMS microbiology letters. 1892:159-164.
- He BB, Thompson JC, Routt DW, Van Gerpen JH. 2006. Moisture Distribution in Biodiesel and Its Fossil Diesel Blends. In 2006 ASAE Annual Meeting. American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Toscano L, Gochev V, Montero G, Stoytcheva M. 2011. Enhanced Production of Extracellular Lipase by Novel Mutant Strain of *Aspergillus Niger*. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 35:2243–2247.
- Ulfing K, Płaza G, Worsztynowicz A, Mańko T, Terakowski M. 2006. The occurrence of keratinolytic and non-keratinolytic fungi in petroleum hydrocarbon-contaminated soil in biopiles after bioremediation. Institute for Ecology of Industrial Areas, Katowice. (unpublished report)
- Van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM, Witholt B. 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil Gas Sci Technol 58:427–440.
- Van Beilen JB et al. 2006. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. Appl Environ Microbiol 72:59–65.
- Van Beilen JB, Funhoff EG. 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. Applied microbiology and biotechnology. 74(1): 13-21.
- Van Bogaert IN, De Mey M, Develter D, Soetaert W, Vandamme EJ. 2009. Importance of the cytochrome P450 monooxygenase CYP52 family for the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*. FEMS yeast research. 10(6):791-791.
- Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67(4):503-549.
- Yaakob Z. 2014. A review on the oxidation stability of biodiesel. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 35(0):136—153.
- Zanaroli G, Di Toro S, Todaro D, Varese GC, Bertolotto A, Fava F. 2010. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from an acclimated, complex source of microorganisms. Microbial cell factories. 9(1):10.
- Zhang, X. 1998. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. Transactions of American Society of Agricultural Engineers, St. Joseph. 41: 1423-1430.
- Zheng C, Li Z, Su J, Zhang R, Liu C, Zhao M. 2012. Characterization and emulsifying property of a novel bioemulsifier by *Aeribacillus pallidus* YM-1. J. Appl. Microbiol. 113:44–51.
- Zimmer A, Cazarolli J, Teixeira RM, Viscardi SLC, Cavalcanti ESH, Gerbase AE, ..., Bento FM. 2013. Monitoring of efficacy of antimicrobial products during 60 days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). Fuel. 112:153-162.

### Livros:

- Allsopp DSK, Seal KJ, Gaylarde CC, Bento FM, Shirakawa M. 2016. Cap 3

- Biodeterioração de Materiais Refinados e Processados. Em: **Introdução à Biodeterioração**, 1º edição. Editora UFRGS, Porto Alegre, Capítulo 3:59-131
- Bento FM, Camargo FAO, Gaylarde CC. 2008. Cap 7 Biosurfactantes. Em: **Microbiologia Ambiental**, 2º edição. Embrapa. Capítulo 7:151-184.
- Bento FM, Allsopp D, Seal K, Gaylarde C, Shirakawa. 2016. Cap 3 Biodeterioração de Materiais Refinados e Processados. Em: **Introdução à Biodeterioração**, 1º edição. Editora UFRGS, Porto Alegre, Capítulo 3:59-131.
- Chapelle F. 2001. **Ground-water microbiology and geochemistry**. John Wiley & Sons.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa – CENARGEN. 220.
- Júnior EJSP. 2016. Cap 1 Evolução da Indústria do Biodiesel no Brasil Em: **Biodiesel no Brasil: Impulso Tecnológico**. 1º edição. Lavras: UFLA. Capítulo 1:19-40.
- Knothe G, Gerpen JV, Krahl J, Ramos LP. 2006. **Manual do Biodiesel**. Traduzido do original “The Biodiesel Handbook” por Luiz Pereira Ramos, São Paulo: Edgard Blücher.
- Pepper IL, Gerba CP, Gentry TJ, Maier RM. 2011. **Environmental Microbiology**. Academic Press. 624.

#### Dissertações e teses:

- Beker SA. 2014. **Avaliação do potencial antimicrobiano de tbhq (terc-butil-hidroquinona) e de bio-óleo para uso em biodiesel de soja (B100) e óleo diesel B (B10)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Bücker F. 2010. **Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com antimicrobianos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Bücker 2015. **Caracterização molecular, biodegradação e controle de biofilmes formados durante o armazenamento simulado de misturas de diesel e biodiesel**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Castrillón, MR. 2012. **Tipagem molecular de leveduras associadas a vinhos do sul do Brasil : padronização de MSP-PCR Fingerprinting**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Cazarolli JC. 2013. **Avaliação de fungos filamentosos em biodiesel de linhaça, soja e oliva**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Cerqueira VS. 2011. **Biorremediação de borra oleosa proveniente de indústria petroquímica em microcosmos**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.)
- De Azambuja AO. 2016. **Avaliação da contaminação microbiana durante armazenamento simulado da mistura B10 e óleo diesel com diferentes teores de enxofre**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do

- Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre
- Horel A. 2009. **Biodegradation of Petroleum and Alternative Fuel Hydrocarbons in Moderate and Cold Climate.**(Ph.D. Thesis) - Department of Civil and Environmental Engineering, University of Alaska Fairbanks, Fairbanks, AK.
- Meyer DD. 2010. **Avaliação da biodegradabilidade das misturas de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Parbey DG. 1970. **The kerosene fungus, *Amorphoteca resiniae*; its biology, taxonomy and control.**(Ph.D. Thesis) - Universidade de Melbourne, Australia.
- Parente EJS. 1993. **Proposta de um Óleo Diesel Alternativo.** Tese do Concurso para Professor Titular do Departamento de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da UFC.
- Santos MA. 2007. **Inserção do biodiesel na matriz energética brasileira: aspectos técnicos e ambientais relacionados ao seu uso em motores de combustão.**Dissertação (Mestrado em Energia) - EP/ FEA/ IEE/ IF da Universidade de São Paulo, USP.
- Schultz LC. 2010.**Avaliação de micro-organismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Souza MM. 2012. **Biodegradação de Misturas diesel e Biodiesel por micro-organismos de água portuária.**Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) — Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS, Brasil.

#### Internet:

- Agência Nacional De Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Resolução ANP Nº 50, de 23.12.2013** - DOU 24.12.2013 Disponível em:<<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 15 maio 2015.
- BiodieselBR. **Biocombustíveis - Da primeira a quarta geração.** 2008. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/destaques/2007/biocombustiveis-primeira-quarta-geracao-10-03-08.html>>. Acesso em: 28 nov. 2016.
- BRENDA Enzymes. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.1.1.1>>. Acesso em: 05 ago 2016.
- EBB. European Biodiesel Board. 2016. Disponível em <<http://www.ebb-eu.org/biodiesel.php#eupro>>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- Cavalcanti EHS, Resende V, Pacheco HGJ. 2012. **Monitoramento de não conformidades de natureza abiótica e de origem operacional observadas no biodiesel e na mistura biodiesel/diesel.** Anais: Workshop Controle Pleno da Qualidade do Biodiesel e Mistura com Diesel. Brasília, DF. 19-32. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agroenergia/busca-de-publicacoes/-/publicacao/990144/anais>>. Acesso em: 27 nov 2016.

Martins CRF. 2001. Técnica de Coloração de Gram. Brasília: Ministério da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Disponível em <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115\\_03gram.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf)>. Acesso em 02 nov 2016.

MME. Ministério de Minas e Energia. 2016. Disponível em <[http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/programa/objetivos\\_diretrizes.html](http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/programa/objetivos_diretrizes.html)> Acesso em: 20 dez. 2016.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>>. Acesso em: 10 jul 2016

## 9 ANEXOS

## 9.1 Certificado de qualidade de diesel fornecido pela Petrobras.



Número: 1700-15 G

CÓPIA

## CERTIFICADO DE ENSAIO

Produto: OLEO DIESEL A S10

Código: 6DH

Local de Amostragem: TQ 24576G  
 Data/ hora Amostragem: 03/08/15 22:15  
 Data/ hora Recebimento: 03/08/15 22:45

Laboratório REFAP/OT/QP  
 Endereço: Av. Getúlio Vargas, 11001  
 92420-221 Canoas - RS  
 Telefone: (51)3415-2243 Fax: (51)3415-2246

Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
ASPECTO	D 4176	PASS (1)	PASS	N/A
COR	VIS 000	INAM (3)	INAM	N/A
COR ASTM	D 1500	3,0 max (2)	L1,0	N/A
10% RECUPERADOS	D 86	180,0 min	208,6	grau C
50% RECUPERADOS	D 86	245,0 a 295,0	251,6	grau C
95% RECUPERADOS	D 86	370,0 max	349,0	grau C
PONTO DE ENTUPIMENTO	D 6371	0 max	-5	grau C
MASSA ESPECIFICA A 20 GC	D 4052	815,0 a 850,0	841,9	kg/m <sup>3</sup>
VISCOSIDADE CINEMATICA A 40 GC	D 445	2,0 a 4,5	2,555	mm <sup>2</sup> /s
CORROSIVIDADE AO COBRE 3H 50 GC	D 130	1 max	1A	N/A
ESTABILIDADE A OXIDACAO	D 5304	2,5 max	0,5	mg/100 mL
CINZAS	D 482	0,010 max	<0,0010	% massa
RCR NOS 10% FINAIS DA DESTILACAO	D 524	0,25 max	0,07	% massa
NÚMERO DE CETANO - NCD	D 6890	48 min	48,0	N/A
TEOR DE AGUA	D 6304	200 max	45	mg/kg
HIDROCARBONETOS POLICICLICOS AROMATICOS	D 6591	11 max	2,1	% massa
PONTO DE FULGOR	D 93	38,0 min	72,0	grau C
INDICE DE ACIDEZ TOTAL	D 974	Anotar	<0,02	mg KOH/g
ENXOFRE TOTAL	D 5453	10,0 max	<1,0	mg/kg
CONDUTIVIDADE ELÉTRICA	D 2624	25 min	70	pS/m
TEMPERATURA OBSERVADA	D 2624	Anotar	20,4	grau C
NÚMERO DO LACRE	PE LACRE	Anotar	0027764	N/A

**Notas:**

- Todos os limites especificados são valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29.
- RESOLUÇÃO ANP nº50 DE 23 DEZEMBRO DE 2013 - DOU 24.12.13.
- Atende a Resolução ANP Nº 69, de 23 de dezembro de 2014.
- Resolução ANP nº 13/2015.
- (1) PASS(PASSA)=Limpido e isento de impurezas.
- (2) Limite requerido ao óleo diesel A isento de corante.
- (3) Coloração entre o incolor e o amarelado, podendo o tipo B apresentar-se ligeiramente alterado para as tonalidades marrom e alaranjada.

Data de Emissão: 04/08/2015 22:13:17

Página: 1 de 1

Os resultados deste Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada.  
 Este certificado só pode ser reproduzido integralmente com a autorização do responsável pelo seu conteúdo.

Original Assinado Por:

Responsável:  
 Q de Petróleo Priscila Perin Guastalli  
 CRQ: 09302440

## 9.2 Certificado de qualidade de biodiesel fornecido pela Bianchini.



## CERTIFICADO DE QUALIDADE

Nº 082 – 15 – 18 de Agosto de 2015

Identificação do Produtor	Bianchini S/A Indústria Comércio e Agricultura Rua Antônio João Bianchini, 1800 – Canoas – RS
Data de Entrada da Amostra:	13/08/15
Data de Realização dos Ensaio:	13/08/2015 - 17/08/2015

Dados do Produto			
Produto:	Éster Metílico de Óleo de Soja (Biodiesel)		
Identificação da Amostra:	Lote: BB-CN-032-15	Tanque: 1404	Volume: 5.442.379 L
Composição da Matéria Prima:	100% Óleo de Soja	Data de Produção:	12/08/15
Rota de Produção:	Metilica	Lacres da Amostra:	0065865/0065866
Lacres do Tanque:	Entrada:77090/77087 Saída: 77092/77029		
Relatório de Ensaio N°	036-15		

Característica	Resultado	Especificação(1)	Método de Ensaio
Aspecto a 29,1 °C	LII	LII	VISUAL
Massa Específica a 20°C	881,2 kg/m <sup>3</sup>	850,0 – 900,0 kg/m <sup>3</sup>	NBR 14065:2013
Viscosidade Cinemática a 40°C	4,1 mm <sup>2</sup> /s	3,0– 6,0 mm <sup>2</sup> /s	NBR 10441:2007
Teor de Água	161 mg/kg	Máx. 200 mg/kg	EN ISO 12937:2000
Contaminação Total	19,0 mg/kg	Máx. 24 mg/kg	EN 12662:2014
Ponto de Fulgor	133,0 °C	Mín. 100 °C	ASTM D93-15- Procedimento C
Teor de Éster	99,5 % massa	Mín. 96,5% massa	EN 14103:2011
Enxofre Total	1,4 mg/kg	Máx. 10 mg/kg	ASTM D 5453-12
Sódio + Potássio	1,1 mg/kg	Máx. 5 mg/kg	EN 14538:2006
Cálcio + Magnésio	0,7 mg/kg	Máx. 5 mg/kg	EN 14538:2006
Fósforo	< 0,5 mg/kg	Máx. 10 mg/kg	EN 14107:2003
Ponto de Entupimento	- 2 °C	(2)	NBR 14747:2008
Índice de Acidez	0,15 mg de KOH/g	Máx. 0,50 mg KOH/g	NBR 14448:2013 – Método B
Glicerol Livre (4)	0,01 % massa	Máx. 0,02% massa	ASTM D 6584 <sup>e1</sup> – 13
Glicerol Total (4)	0,20 % massa	Máx. 0,25% massa	ASTM D 6584 <sup>e1</sup> – 13
Monoacilglicerol (4)	0,63 % massa	Máx.0,70% massa	ASTM D 6584 <sup>e1</sup> – 13
Diacilglicerol (4)	0,15 % massa	Máx. 0,20% massa	ASTM D 6584 <sup>e1</sup> – 13
Triacilglicerol (4)	0,07 % massa	Máx. 0,20% massa	ASTM D 6584 <sup>e1</sup> – 13
Metanol	0,09 % massa	Máx. 0,20% massa	EN 14110:2003
Índice de Iodo	129 g I <sub>2</sub> /100g	Anotar	EN 14111:2003
Estabilidade Oxidativa	13,2 Horas	Mín. 8 Horas	EN 14112:2003

LII = Limpo e Isento de Impurezas

(1) Especificação de acordo com o Regulamento Técnico ANP N°3/2014.

(2) Limite: Jan – Mar: 14°C, Abr: 10°C, Mai – Set: 5°C, Out: 10°C, Nov-Dez: 14°C

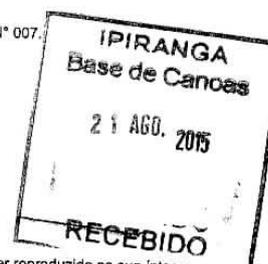
(3) Todos ensaios foram realizados neste laboratório

(4) Ensaio realizado no Laboratório da BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A - Cadastro ANP N° 007.

FABIANA  
ROGERIO  
DE  
MEDEIROS

Assinado digitalmente por  
FABIANA ROGERIO  
DE MEDEIROS  
Data: 2015.08.18  
11:09:44 -0300

CRQ 05201925 – V Região  
Signatário Autorizado



Os resultados acima se referem somente a amostra ensaiada. Este laudo só pode ser reproduzido na sua íntegra.

Laboratório de Controle de Qualidade  
Rua Antônio João Bianchini, 1800 – Canoas – RS  
Registro no CRQ-V n° 2340 – Cadastro na ANP n° 51(3).

## 9.3 Meio Mínimo Mineral Bushnell &amp; Haas (pH 7,2)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g L <sup>-1</sup>
FeCl <sub>3</sub>	0,05 g L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 g L <sup>-1</sup>

## 9.4 Meio de cultura ágar malte (pH 5,4)

Extrato de Malte	30 g L <sup>-1</sup>
Peptona	5 g L <sup>-1</sup>
Ágar	15 g L <sup>-1</sup>

## 9.5 Meio ágar tributirina (pH 7,1 ± 0,2)

Peptona de carne	2,5 g L <sup>-1</sup>
Peptona de caseína	2,5 g L <sup>-1</sup>
Extrato de levedura	3,0 g L <sup>-1</sup>
Ágar	20,0g L <sup>-1</sup>
Tributirina*	10mL L <sup>-1</sup>

\* Adicionar tributirina aos poucos no frasco em agitador magnético

## 9.6 Caldo malte (pH 5,4)

Extrato de Malte	30 g L <sup>-1</sup>
Peptona	5 g L <sup>-1</sup>

## 9.7 Certificado de qualidade do óleo diesel fornecido pela Ipiranga



CLIENT : IPIRANGA  
 VESSEL : M/T TURMOIL  
 PRODUCT : DIESEL S10  
 INSTALLATION : CATTALINI TERMINAL-PARANAGUA-PARANA, BRAZIL  
 SAMPLES DRAWN BY : INTERTEK DO BRASIL INSPEÇÕES LTDA.  
 YOUR RE : PI05/16  
 DATE OF OPERATION : MAY 01<sup>ST</sup> TO 03<sup>RD</sup>, 2016  
 CBB RE. : PAR 7329/2016  
 REPRESENTING : SHORE'S TANK 406

### CERTIFICATE OF QUALITY

Analysis performed at Intertek-Santos laboratory.

Method Number	Test Description	Results	Spec Min	Spec Max	Units
D130	Corrosion, Copper Strip, 3hrs@50°C	1	-	1	-
D445	Viscosity at 40°C (**)	2.39	2.0	4.5	mm <sup>2</sup> /s
D86	Dist. 10% Recovered (***)	198.7	-	-	°C
D86	Dist. 50% Recovered (***)	256.8	245	295	°C
D86	Dist. 85% Recovered (***)	318.9	-	-	°C
D86	Dist. 90% Recovered (***)	347.6	-	-	°C
D86	Dist. 95% Recovered (***)	352.0	-	370	°C
D6371	Cold Filter Plug Point (CFPP)	-9	-	12	°C
D524	Carbon residue 10% residue at the of distillation	0.10	-	0.25	mass%
D5453	Sulfur	10	-	10	mg/kg
D482	Ash (***)	<0.001	-	0.010	mass%
D6304	Water Content (***)	41	-	200	mg/kg
EN12662	Total Contamination	1.4	-	24	mg/kg
D2709	Water and Sediments	0.005	-	-	vol%
Visual	Color (***)	(*)	-	(*)	-
D4176	Appearance (***)	(**)	-	(**)	-
D1500	ASTM Color (***)	L1.0	-	3.0	-
D2274	Stability oxidation	0.3	-	2.5	mg/100ml
D664	Acid Number	0.05	-	-	mgKOH/g
D4052	Density at 20°C (Vac) (***)	826.3	815	865	kg/m <sup>3</sup>
D4052	Density at 20°C (Air) (***)	825.2	815	865	kg/m <sup>3</sup>
D2624	Electrical Conductivity	45	30	-	pS/m
D2624	Observed Temperature	23.5	-	-	°C
D93	Flash Point (**)	67	38	-	°C

(\*) Colorless to orange

(\*\*) Clear and without impurities

(\*\*\*) Tests performed at Intertek-Paranaguá laboratory

Santos, May 09<sup>th</sup>, 2016.



Intertek do Brasil Inspeções Ltda  
 Dennyel Victor Silva de Oliveira  
 CRQ 04488683 4ª Region



**ISO 9001:2008**

Certificate Number 30517  
 Certified Quality System



## 9.8 Certificado de ensaio de biodiesel fornecido pela 3 Tentos.

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE DE BODIESEL					
CERTIFICADO DE QUALIDADE					
3 TENTOS AGROINDUSTRIAL S/A					
Número: CQ.LCB.011/2016			Data: 13/05/2016		
<b>1. ORIGINAÇÃO DO BODIESEL</b>					
ROTA ALCOOLICA:	Metilica	MATÉRIA PRIMA:		100 % Óleo De Soja	
<b>2. AMOSTRAGEM</b>					
LOTE:	TQ51610052016	TANQUE:	TQ516 0017601; 0017611;		
VOLUME DO LOTE:	2100m <sup>3</sup>	LACRES DO TANQUE:	0017640		
DATA DE PRODUÇÃO:	01/05/2016 a 07/05/2016	LACRES DAS AM. TESTEMUNHAS:	0017605; 0017616		
DATA DA ANÁLISE:	11/05/2016				
<b>3. INFORMAÇÕES ADICIONAIS</b>					
Especificações de acordo com a Resolução ANP N.º 45 de 25/08/2014 - DOU 26.08.2014. Regulamento Técnico ANP n.º 03/2014.					
<b>4. RESULTADOS ANALÍTICOS</b>					
ANÁLISES	RESULTADO	UNIDADE	LIMITE	NORMA DE REFERÊNCIA	LABORATÓRIO/BBD
Aspecto	LII -29,1 <sup>(2)</sup>	-	LII (1)	VISUAL	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Massa específica a 20°C	881,1	kg/m <sup>3</sup>	850 - 900	NBR 14065:2013	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Viscosidade cinemática a 40°C	4,126	mm <sup>2</sup> /s	3,0 - 6,0	NBR 10441:2014	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Teor de água	196	mg/kg	máx: 200	EN ISO 12937:2000	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Contaminação total	8,0	mg/kg	máx: 24	EN 12662/2008	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Ponto de fulgor	165	°C	mín: 100,0	ASTM D 93/2015 Procedimento C	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Teor de Éster	99,3	% massa	mín: 96,5	EN 14103/2011	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Enxofre Total	0,8	mg/kg	máx: 10	ASTM D 5453/2012	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Sódio + potássio	1,0	mg/kg	máx: 5	EN 14538/2006	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Cálcio + magnésio	<0,5	mg/kg	máx: 5	EN 14538/2006	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Fósforo	<0,5	mg/kg	máx: 10	EN 14107/2003	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Ponto de Entupimento	-4	°C	máx: 14	NBR 14747:2008	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Índice de acidez	0,23	mg KOH/g	máx: 0,50	NBR 14448:2013 Método B	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Glicerol livre	0,006	% massa	máx: 0,020	ASTM D 6584/2013 <sup>e1</sup>	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Glicerol total	0,171	% massa	máx: 0,25	ASTM D 6584/2013 <sup>e1</sup>	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Monoacilglicerol	0,590	% massa	máx: 0,70	ASTM D 6584/2013 <sup>e1</sup>	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Diacilglicerol	0,079	% massa	máx: 0,20	ASTM D 6584/2013 <sup>e1</sup>	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Triacilglicerol	0,030	% massa	máx: 0,20	ASTM D 6584/2013 <sup>e1</sup>	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Índice de Iodo	129	g <sub>2</sub> /100g	Anotar	EN 14111/2003	BIANCHINI/*BBD 082 - 16
Estabilidade a oxidação a 110°C	10,2	h	mín: 8	EN 14112/2003	BIANCHINI/*BBD 082 - 16

\*BBD = Boletim de Análise emitido pelo Laboratório Externo BIANCHINI cadastrado na ANP sob nº 051;  
<sup>(1)</sup>Limpido isento de impurezas <sup>(2)</sup>Temperatura durante a observação.

IPIRANGA  
17 MAIO 2016  
RECEBIDO

*Marcia Veroneze Bisol*

MARCIA VERONEZE BISOL  
RESPONSÁVEL TÉCNICA  
CRQ V05202059

### 9.9 Meio de cultura ágar GYMP

Extrato de malte	20 g L <sup>-1</sup>
Extrato de levedura	5 g L <sup>-1</sup>
Fosfato de sódio monobásico	2 g L <sup>-1</sup>
Glicose	20 g L <sup>-1</sup>
Ágar	15 g L <sup>-1</sup>

### 9.10 Meio de cultura caldo GYMP

Extrato de malte	20 g L <sup>-1</sup>
Extrato de levedura	5 g L <sup>-1</sup>
Fosfato de sódio monobásico	2 g L <sup>-1</sup>
Glicose	20 g L <sup>-1</sup>