



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

Juciana Clarice Cazarolli

POTENCIAL DETERIOGÊNICO DA MICROBIOTA NATIVA
DE BIODIESEL DE SOJA (RS), BRASIL

Porto Alegre

2019

Juciana Clarice Cazarolli

**POTENCIAL DETERIOGÊNICO DA MICROBIOTA NATIVA
DE BIODIESEL DE SOJA (RS), BRASIL**

Tese de Doutorado 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 Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Menezes Bento

Porto Alegre

2019

Cazarolli, Juciana Clarice
Potencial Deteriogênico da Microbiota Nativa de
Biodiesel de Soja (RS), Brasil / Juciana Clarice
Cazarolli. -- 2019.
234 f.
Orientador: Fátima Menezes Bento.

Tese (Doutorado) -- 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, 2019.

1. Biodeterioração. 2. Fungo. 3. Biodiesel. 4.
Aditivos. 5. Levedura. I. Bento, Fátima Menezes,
orient. II. Título.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família por todo apoio, amor incondicional, carinho e estímulo à busca dos meus sonhos de qualificação profissional. Agradeço ao meu pai, minha mãe, minha irmã, meu cunhado, minha sobrinha e afilhada Beatriz, assim como aos sobrinhos a caminho por serem meu porto seguro.

Ao amor da minha vida, Eduardo Verruck Acker, obrigada pelo suporte emocional, pelo incentivo, pelas puxadas de orelha quando necessário e por todo amor e compreensão que tiveste nesse meu período de formação. À tua família também pelo apoio e carinho.

À minha orientadora, amiga, professora e maravilhosa pessoa que eu tive o prazer de conhecer, Prof.^a Fátima Menezes Bento, que me acolheu desde o TCC e me fez crescer, tanto como profissional quanto como pessoa. Este trabalho reflete a confiança que depositaste em mim, bem como teu amor pela profissão, te levo como exemplo para minha vida. Também agradeço à tua família pela acolhida, amizade e compreensão dispensados durante todo esse período.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento do projeto. Em especial aos professores do Instituto de Química da UFRGS que conheci e com os quais tive o prazer de trabalhar, Prof.^a Maria do Carmo Ruaro Peralba, Prof. Marco Flores Ferrão, Prof. Dimitrios Samios, Prof.^a Clarisse Piatinicki, Prof.^a Márcia Martinelli, Prof.^a Tânia Maria Pizzolato e respectivos alunos de pós-graduação e iniciação científica e técnicos administrativos que muito ajudaram a elucidar vários pontos-chaves desta tese. Na mesma intensidade agradeço por todo auxílio ao pessoal do Centro de Combustíveis da UFRGS (CECOM).

Ao pesquisador Eduardo H. S. Cavalcanti, à Prof.^a Simoni Meneghetti, ao Prof. Nelson Antoniosi Filho, à Prof.^a Maria Aparecida Ferreira César-Oliveira e sua aluna Dr.^a Aline Silva Muniz, pela confiança e parceria durante esses meus anos de doutorado.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA) e do ICBS, Prof.^a Patrícia Valente, Prof.^a Marisa da Costa, Prof.^a Gertrudes Corção, Prof.^a Maria Lúcia Scroferneker, Prof.^a Ana Paula Frazzon, Prof. Jeverson Frazzon, Prof.^a Amanda Motta, Prof.^a Andreza Martins, Prof.^a

Ana Cláudia Franco, Prof.^a Sueli Van Der Sand, Prof.^a Mercedes Passos Geimba, Prof.^a Ilma Simoni Brum da Silva por todos os ensinamentos e tempo despendido com meu aprendizado.

Aos técnicos Eladir Rodrigues, Gabriela dos Santos Sant Anna, Chris Krebs, Amanda Domingues e demais técnicos administrativos do ICBS o meu muito obrigada por todo auxílio durante a execução do meu projeto. Ao pessoal da portaria do ICBS, Angela, Alessandra, Jussara, José e Cesar pelo bom dia e boa tarde repleto de sorrisos e pelo chimarrão, às vezes necessário para enfrentar o dia.

Aos amigos Grasiela Agnes, Tiane Martin de Moura, Michele Bertoni Mann, Letícia Xavier Costa, Priscila Dallé da Rosa, Carine Tavares de Souza, Audren Monteiro Vieira, Silvia Lenz, Raíssa Nunes, Naihana Schaffer, Cláudio Lauer, Diego Kenne, Ânderson Ramos Carvalho e Márcia Bisol muito obrigada por toda ajuda, pela amizade e pelo apoio nesse período.

Aos colegas do Laboratório LAB-BIO: Gabriela Boelter, Sabrina Beker, Thais Nascimento Silva, Mariane Rodrigues Lobato, Patrícia Quadros, Rodolfo Ribas, Jhonata Brito, Francielle Bucker e Aline Oliboni de Azambuja pela amizade, coleguismo e parceria em todos esses anos juntos.

Às minhas colegas e amigas da Biologia da UFRGS, presentes até hoje desde a nossa graduação, sempre prontas para me ouvirem, repletas de amor e carinho. Em especial, à colega e amiga Edilena Reis Sperb (in memoriam), obrigada por ter me dado a honra de ter sido sua amiga, um dia nos reencontraremos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão de bolsa e fomentos necessários para o desenvolvimento desta tese.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a execução, seja física, financeira ou emocional de todos os trabalhos gerados nos 4 anos de doutorado, incluindo todos os autores dos artigos já publicados e ainda a serem publicados.

Muito obrigada!

POTENCIAL DETERIOGÊNICO DA MICROBIOTA NATIVA DE BIODIESEL DE SOJA (RS), BRASIL¹

Autora: Juciana Clarice Cazarolli

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Menezes Bento

RESUMO

Durante a estocagem, o biodiesel é suscetível a reações químicas e biológicas. A adição de aditivos químicos é indicada para aumentar a estabilidade em relação à degradação biótica e abiótica durante o armazenamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial deterio gênico de comunidades microbianas presentes em biodiesel e a possibilidade do uso de compostos naturais como aditivos. O fundo de um tanque de estocagem de biodiesel foi coletado e a composição química e microbiana investigada. A influência de diferentes teores de água foi avaliada com tratamentos com os fungos *Aureobasidium pullulans* e *Penicillium simplicissimum*, biodiesel como recebido, e um inóculo não caracterizado (ASTM E1259). O sedimento coletado foi definido como sendo ésteres de ácidos graxos e íons metálicos e a comunidade microbiana cultivável composta por bactérias e fungos filamentosos. A levedura *A. pullulans* foi detectada em amostras de biodiesel e caracterizada como deterio gênica, pois causou a degradação dos ésteres (10%). Após 30 dias foi observado que o tempo de incubação, os teores de água e aporte de nutrientes causaram modificações no crescimento microbiano e na comunidade fúngica do inóculo ASTM, por sequenciamento de alto rendimento (Illumina Miseq). O meio mineral foi considerado seletivo quanto aos táxons presentes no inóculo inicial. Foram avaliados 16 compostos quanto à atividade antimicrobiana frente ao inóculo ASTM. Não foi detectada atividade inibitória nos compostos naturais avaliados nas condições propostas. O óleo de pirólise de casca de arroz, em concentração superior a 5000 ppm, apresentou atividade biocida após 15 dias. Os valores de biomassa ao final do experimento indicaram que os aditivos promoveram maior crescimento quando comparados ao controle.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (230 p.) Março, 2019.

DETERIOGENIC POTENTIAL OF NATIVE MICROBIOTA FOUND IN SOYBEAN BIODIESEL (RS), BRAZIL²

Author: Juciana Clarice Cazarolli

Advisor: Prof. Dr. Fátima Menezes Bento

ABSTRACT

During storage, biodiesel is susceptible to chemical and biological reactions. The addition of chemical additives is indicated to increase storage stability related to biotic and abiotic degradation. The objective of this work was to evaluate the deteriorogenic potential of microbial communities present in biodiesel and the possibility of using natural compounds as additives. The bottom of a biodiesel storage tank was collected and the chemical and microbial composition investigated. The influence of different water contents and contamination levels were evaluated with treatments such as: *Aureobasidium pullulans* and *Penicillium simplicissimum* fungi, biodiesel as received, and a non - characterized inoculum (ASTM E1259), in simulated storage. The sediment composition was defined as esters of fatty acids and metal ions and the microbial community cultivable was composed of bacteria and filamentous fungi. Yeast *A. pullulans* was detected in biodiesel samples and characterized as a deteriorogenic species, as it may cause changes in the appearance and degradation of the esters (10%). After 30 days, it was observed that incubation time, water content and nutrient supply caused changes in the detected biomass and in the fungal community of the ASTM inoculum, by high-throughput sequencing (Illumina Miseq). The mineral medium was considered selective for the taxa present in the initial inoculum. 16 compounds were evaluated for their antimicrobial activity against the ASTM inoculum. No inhibitory activity was detected for the natural compounds under the proposed conditions. The rice husk pyrolysis oil presented biocidal activity after 15 days, in a concentration higher than 5000 ppm. The biomass values at the end of the experiment indicated that the additives promoted higher growth when compared to the control.

² Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (230 p.) March, 2019.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1	MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA.....	29
3.2	BIODIESEL: PRODUÇÃO E PROPRIEDADES	32
3.3	DEGRADAÇÃO ABIÓTICA	36
3.4	DEGRADAÇÃO BIÓTICA.....	38
3.5	PROPRIEDADES E USO DE ADITIVOS	42
4	PUBLICAÇÃO 1: CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL INSOLÚVEL ENCONTRADO NO FUNDO DE TANQUES DE ESTOCAGEM DE BIODIESEL DE SOJA	51
4.1	RESUMO.....	51
4.2	INTRODUÇÃO	52
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.3.1	Amostragem do Fundo do Tanque de Estocagem.....	54
4.3.2	Caracterização Química	54
4.3.2.1	Análise por infravermelho.....	54
4.3.2.2	Análise da presença de esteroides por HPLC-MS/MS	55
4.3.2.3	Análise inorgânica	56
4.3.3	Avaliação da Comunidade Microbiana Presente no Sedimento.....	57
4.3.3.1	Identificação dos isolados cultiváveis	58
4.3.4	Capacidade Deteriogênica da Borra de B100.....	58
4.3.5	Análises Estatísticas	60
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.4.1	Análise química do sedimento de B100.....	60
4.4.1.1	Análise por infravermelho.....	60
4.4.1.2	Análise da presença de esteróis glicosídeos na borra	62
4.4.1.3	Análise inorgânica da borra de B100.....	64
4.4.2	Isolamento de Microrganismos Cultiváveis	64

4.4.2.1	Detecção da capacidade de produção de enzimas hidrolíticas.....	65
4.4.3	Capacidade Deteriogênica de Microrganismos Nativos da Borra.....	66
4.4.3.1	Crescimento Microbiano.....	66
4.4.3.1.1	Peso seco.....	66
4.4.3.2	Medidas de pH.....	68
4.4.3.3	Avaliação da migração de compostos do biodiesel para a fase aquosa e o seu consumo pela comunidade microbiana presente nas amostras.....	69
4.4.3.4	Análise de infravermelho: biodegradação da fase oleosa.....	71
4.5	CONCLUSÕES.....	74
4.6	AGRADECIMENTOS.....	74
4.7	CONFLITOS DE INTERESSE.....	74
4.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
5	PUBLICAÇÃO 2: POTENCIAL DETERIOGÊNICO DE <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS</i> SOBRE BODIESEL, DIESEL E A BLEND A B20.....	81
5.1	HIGHLIGHTS.....	81
5.2	RESUMO.....	81
5.3	INTRODUÇÃO.....	82
5.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	84
5.4.1	Fungo.....	84
5.4.2	Inóculos.....	85
5.4.2.1	Inóculo 1.....	85
5.4.2.2	Inóculo 2.....	86
5.4.3	Avaliação da Produção de Lipase pelo Isolado <i>Aureobasidium pullulans</i>.....	86
5.4.4	Detecção de Genes de Lipases/Carboxilesterases.....	87
5.4.5	Produção de Vesículas de Óleo na Presença de Duas Fontes de Carbono Distintas.....	88
5.4.6	Morfologia Celular da Levedura em Diferentes Substratos por Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura.....	90
5.4.7	Curva de Crescimento do <i>A. pullulans</i> em Biodiesel de Soja, em Diesel de Petróleo e na Mistura B20.....	90
5.4.7.1	Quantificações do crescimento fúngico.....	91
5.4.7.1.1	PCR Real Time.....	91

5.4.7.1.2	Biomassa formada pela levedura <i>A. pullulans</i> (peso seco).....	92
5.4.7.1.3	Análises da fase aquosa	92
5.4.7.1.4	Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa.....	93
5.4.7.2	Análises da Fase Oleosa.....	93
5.4.7.2.1	Escala Haze	93
5.4.7.2.2	Infravermelho.....	94
5.4.7.2.3	RMN	94
5.4.8	Análises Estatísticas	94
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
5.5.1	Identificação do Isolado	95
5.5.2	Avaliação da Produção de Lipase pelo Isolado <i>Aureobasidium pullulans</i> e Triagem de Genes de Lipases Apresentadas Pelo Isolado.....	95
5.5.3	Produção de Vesículas de Óleo na Presença de Duas Fontes de Carbono Distintas.....	99
5.5.4	Morfologia Celular da Levedura na Presença de Diferentes Substratos por Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura	105
5.5.5	Curva de Crescimento da <i>Aureobasidium pullulans</i> em Biodiesel de Soja, em Diesel de Petróleo e na Mistura B20	108
5.5.5.1	Biomassa.....	108
5.5.5.2	pH.....	111
5.5.5.3	SPME/GCMS.....	113
5.5.5.4	Escala Haze	114
5.5.5.1	Infravermelho e RMN	116
5.6	CONCLUSÕES	122
5.7	AGRADECIMENTOS	122
5.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
6	PUBLICAÇÃO 3: IMPACTO DO TEOR DE ÁGUA PRESENTE NO BIODIESEL NO CRESCIMENTO E ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS DURANTE ESTOCAGEM SIMULADA	133
6.1	HIGHLIGHTS.....	133
6.2	RESUMO.....	133

6.3	INTRODUÇÃO	134
6.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	137
6.4.1	Avaliação da Influência do Teor de Água em Biodiesel Durante Estocagem Simulada	137
6.4.1.1	Contaminação do teor de água	137
6.4.1.2	Contaminação microbiana.....	138
6.4.1.3	Análises químicas e físicas	139
6.4.1.4	Análises microbiológicas	139
6.4.1.4.1	Análise da comunidade fúngica por Sequenciamento de Alto Rendimento	140
6.4.2	Análises Estatísticas	141
6.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	142
6.5.1	Análises Químicas e Físicas	142
6.5.2	Análises Microbiológicas.....	147
6.5.3	Infravermelho	157
6.6	CONCLUSÕES	165
6.7	AGRADECIMENTOS	166
6.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166
7	PUBLICAÇÃO 4: EFEITO ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS VEGETAIS E COMPOSTOS SINTÉTICOS SOBRE UMA COMUNIDADE MICROBIANA DETERIOGÊNICA DE BODIESEL	174
7.1	HIGHLIGHTS.....	174
7.2	RESUMO.....	175
7.3	INTRODUÇÃO	175
7.4	MATERIAL E MÉTODOS	178
7.4.1	Pesquisa Bibliográfica.....	178
7.4.2	Compostos avaliados	178
7.4.3	Seleção de Aditivos com Propriedades Antimicrobianas.....	179
7.4.3.1	Determinação da CMI e CMB.....	180
7.4.4	Análises Estatísticas	181
7.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	181
7.6	CONCLUSÕES	193
7.7	AGRADECIMENTOS	194

7.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	194
8	DISCUSSÃO GERAL.....	202
9	CONCLUSÃO	207
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	209
11	ANEXO A.....	232
12	ANEXO B	233
13	ANEXO C	234

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Compostos avaliados no Brasil com capacidades de uso como aditivos de diesel e biodiesel.....	44
---	-----------

PUBLICAÇÃO 1

Tabela 1 - Condições experimentais dos métodos de análise de esteroides.	55
Tabela 2 - Condições de análise de espectroscopia de absorção atômica de chama (FAAS) para cada analito.	56
Tabela 3 - Identificação por Sequenciamento Sanger e detecção de enzimas pelos isolados obtidos da borra.	65
Tabela 4 - Concentração dos ésteres de ácidos graxos detectados por GC/FID na fase aquosa do experimento aos 2 e 60 dias. Valores entre os tratamentos com a mesma letra sobrescrita são estatisticamente indistinguíveis pelo Teste de Tukey, com $P > 0.05$	70

PUBLICAÇÃO 2

Tabela 1 - Primers desenhados tendo como alvos carboxilesterases (E.C. 3.1.1.1) baseados no genoma de mesma espécie (<i>A. pullulans</i>) depositado no banco de dados NCBI, sob o código de Bioproject: PRJNA207874.....	87
Tabela 2 - Peso seco (mg), pH da fase aquosa e ASTM D4176 (Escala Haze) da fase oleosa recuperada dos frascos contendo crescimento da levedura <i>A. pullulans</i> em biodiesel puro (B100), diesel puro (B0) e mistura B20. Em cada coluna valores entre os tratamentos com a mesma letra sobrescrita são estatisticamente indistinguíveis pelo Teste de Tukey, com $P > 0.05$	109
Tabela 3 - Compostos detectados por GCMS na fase aquosa após 25 dias de incubação de <i>A. pullulans</i> em meio aquoso com biodiesel puro e mistura B20.....	113

PUBLICAÇÃO 3

Tabela 1 – Avaliação da turbidez das amostras oleosas segundo critérios determinados pela escala Haze, de acordo com a norma ASTM D4176 **143**

Tabela 2 - Valores totais de sequências obtidas por Sequenciamento de Alto Rendimento para o tratamento ASTM e respectivos Índices de Diversidade de Shannon para cada teor de água avaliado..... **153**

PUBLICAÇÃO 4

Tabela 1 - Relação dos compostos testados. **179**

Tabela 2 - Valores da Concentração Mínima Inibitória dos compostos testados com um inóculo não caracterizado (ASTM E1259-18)..... **182**

Tabela 3 - Valores da Concentração Mínima Biocida dos compostos testados com um inóculo não caracterizado (ASTM E1259). **183**

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** - Esquema da reação de transesterificação (ACD/ChemSketch).....**32**
Figura 2 - Processo de hidrólise da ligação éster catalisada pelas enzimas lipases ou carboxilesterases. Fonte: Baseada em Santos, 2009.**41**

PUBLICAÇÃO 1

- Figura 1** - Aspecto do material coletado de um tanque de armazenamento de biodiesel comercial da usina de biodiesel.....**54**
Figura 2 - Espectro de Infravermelho médio da amostra de Borra do tanque de estocagem de biodiesel.....**61**
Figura 3 - Cromatogramas referentes à análise das principais classes de esteroides por HPLC-MS/MS.....**63**
Figura 4 - Aspecto dos frascos experimentais com a fase oleosa (biodiesel) e a fase aquosa ao final de 60 dias do experimento. 4A: Tratamento com biodiesel comercial como recebido (CR); 4B: Detalhe do tratamento CR, aspecto das colônias da levedura em meio de cultura; 4C: Fotomicrografias da levedura *Aureobasidium pullulans*; e 4D: Tratamento com biodiesel estéril inoculado com a borra (BI) e aparência da biomassa retida na membrana filtrante. **67**
Figura 5 - Espectros gerados pela técnica de infravermelho das amostras de biodiesel coletadas antes e após 60 dias de incubação a 30 °C.....**72**
Figura 6 - Análise de PCA dos dados gerados pelos espectros de Infravermelho das amostras de biodiesel coletadas antes e após 60 dias de incubação a 30 °C. (B100 – tratamento fase oleosa inicial; CTE – tratamento controle; CR – tratamento como recebido; BI – tratamento com a borra como inóculo).
.....**73**
Figura 7 - Capa do Journal of the Brazilian Chemical Society, volume 29, número 10, de outubro de 2018.**79**
Figura 8 - Artigo da capa do Journal of the Brazilian Chemical Society, volume 29, número 10, de outubro de 2018.**80**

PUBLICAÇÃO 2

- Figura 1** - Atividade de lipase por *A. pullulans* detectada nas condições determinadas.
.....96
- Figura 2** - Gel de agarose 1,5%, corado com Gelred e Bromofenol mostrando as ampliações detectadas para o conjunto de primers referentes à carboxilesterase (legenda: 76: conjunto de primer 76; 77: Conjunto de primer 77; 79: conjunto de primer 79; 80: conjunto de primer 80; 95: conjunto de primer 95; - : controle negativo; A.p.: DNA utilizado do *A. pullulans* LABBIO17; PM: peso molecular).....98
- Figura 3** - Alinhamentos das sequências de nucleotídeos e aminoácidos gerados por comparação com a cepa *A. pullulans* EXF-150.....99
- Figura 4** - Avaliação da produção de vesículas de óleo pela levedura *A. pullulans*.
..... 100
- Figura 5** - Avaliação da produção de vesículas de óleo pela levedura *R. mucilaginosa*.
.....101
- Figura 6** - Avaliação da produção de vesículas de óleo pela levedura *M. guilliermondii*.
.....102
- Figura 7** - Biomassa formada em cada fonte de carbono e porcentagem de óleo produzido para cada levedura. Em cada tratamento, separado por cores, valores entre os tratamentos com a mesma letra sobrescrita são estatisticamente indistinguíveis pelo Teste de Tukey, com $P > 0.05$103
- Figura 8** - Cápsula polissacarídea produzida pela levedura *A. pullulans* detectada por microscopia óptica no meio GYMP (A.1 – microscopia óptica com aumento de 400x) e na presença de biodiesel (B.1 - microscopia óptica com aumento de 400x).105
- Figura 9** - Cápsula polissacarídea produzida pela levedura *A. pullulans* detectada por microscopia eletrônica de varredura no meio GYMP (A.1 – microscopia eletrônica de varredura com aumento de 2.500x e 20.000x) e na presença de biodiesel (B.1 – microscopia eletrônica de varredura com aumento de 2.700x e 20.000x).....106
- Figura 10** - Microscopia eletrônica de varredura do crescimento da levedura *A. pullulans* nas diferentes fontes de carbono, utilizando meio de cultura Gypm (A), meio BDA (B) e meio mínimo mineral com biodiesel (C).....107

Figura 11 - (A) Aspecto visual dos frascos e do crescimento da levedura <i>A. pullulans</i> em B100, B0 e B20 após 25 dias de incubação; (B) visualização da biomassa formada por microscopia óptica, corada com azul de lactofenol (A: 400x).....	109
Figura 12 - Crescimento microbiano em biodiesel puro (B100) e na mistura B20, avaliado pela técnica de qPCR.....	110
Figura 13 - Escala Haze de acordo com a norma ASTM D4176. Amostra que apresentou leve escurecimento indicada pela flecha vermelha. (A.p. – tratamento contendo inóculo fúngico; CTE – tratamento controle estéril).	114
Figura 14 - Espectro de Infravermelho das amostras de (A) diesel puro (B0), (B) mistura B20, (C) biodiesel puro (B100).	116
Figura 15 - Análise de componentes principais e grupamento hierárquico das amostras de diesel puro (B0).	118
Figura 16 - Análise de componentes principais e grupamento hierárquico das amostras de diesel com adição de 20% de biodiesel (B20).	119
Figura 17 - Análise de componentes principais e grupamento hierárquico das amostras de Biodiesel puro (B100).	120
Figura 18 - Espectro de RMN da amostra de biodiesel de soja puro em sua forma inicial. Cada sinal está indicado por uma letra e a região a qual ele representa é indicada nos ésteres mais abundantes da amostra.	121

PUBLICAÇÃO 3

Figura 1 - Variações na temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) durante 28 dias de incubação do experimento.	143
Figura 2 - Índice de estabilidade à oxidação a 110°C da fase oleosa (Rancimat). Limite mínimo preconizado pela Resolução ANP nº. 45/2014 de 6 h.	145
Figura 3 - Teor de água nas amostras de biodiesel determinadas pela técnica de Karl Fischer. Limite máximo preconizado pela Resolução ANP nº. 45/2014 de 200 ppm.	146
Figura 4 - Valores de biomassa recuperada da interface óleo/água dos tratamentos com diferentes comunidades microbianas em diferentes teores de água, após 14 e 30 dias.	148

Figura 5 - Valores de pH observados aos 30 dias de experimento para os tratamentos com maiores teores de água.	151
Figura 6 - Abundância relativa dos grupos fúngicos até nível de Filo encontrados nas amostras do tratamento com um inóculo não caracterizado (ASTM).	153
Figura 7 - Abundância relativa dos grupos fúngicos até nível de classes encontrados nas amostras do tratamento com um inóculo não caracterizado (ASTM).	155
Figura 8 - Espectros obtidos pela técnica de infravermelho das fases oleosas (biodiesel) das condições ASTM (A), RE (B) e PE (C), comparados aos controles (CTE) e tempo inicial (B100).	158
Figura 9 - Análise de componentes principais (PCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos controle (CT) e como recebido (RE) em tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A; 2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B).	159
Figura 10 - Agrupamento hierárquico (HCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos controle (CT) e como recebido (RE) em tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A; 2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B).	160
Figura 11 - Análise de componentes principais (PCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos controle (CT) e ASTM nos tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A; 2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B).	161
Figura 12 - Agrupamento hierárquico (HCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos controle (CT) e ASTM aos tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A; 2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B).	162
Figura 13 - Análise de componentes principais (PCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos controle (CT) e com o fungo <i>P. simplicissimum</i> (PE) nos tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A; 2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B).	163
Figura 14 - Agrupamento hierárquico (HCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos Controle (CT) e com o fungo <i>P. simplicissimum</i> (PE) nos tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A;	

2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B). **164**

PUBLICAÇÃO 4

- Figura 1** - Esquema ilustrativo sobre as diluições dos aditivos e avaliação da viabilidade microbiana (técnica de drop-plate) na determinação das CMI e CMB. **179**
- Figura 2** - Valores de biomassa recuperada dos frascos após 15 dias de incubação com os compostos testados. **185**
- Figura 3** - Microscopia óptica da biomassa detectada para os tratamentos com óleos de pirólise, na concentração mais alta aplicada após 15 dias de incubação. Coloração com Azul de Lactofenol e Aumentos de 400x e 1.000x (imersão).
..... **191**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
ABS	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
ASTM	American Society for Testing and Materials (Sociedade Americana de Testes e Materiais)
ATCC	American Type Culture Collection (Coleção de cultura Americana)
Atm	Atmosfera (pressão)
ATR	Reflectância total
BH	Meio mínimo mineral Bushnell & Haas (1941)
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
BTEX	Compostos benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos
CMB	Concentração Mínima Biocida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EN	European Norms (Normas Européias)
FAAS	Espectroscopia de absorção atômica de chama
FAMES	Ésteres metílicos de ácidos graxos
FID	Flame ionization detector (Detector de ionização de chama)
g	Gramas
GA	Ácido gálico
GC	Cromatografia Gasosa
GCMS	Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massas
h	Horas

HCA	Análise por agrupamento hierárquico
HPAs	Hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e policíclicos aromáticos
HPLC-MS/MS	High-performance Liquid Chromatography – Mass spectrometry (Cromatografia Líquida de Alta Performance - Espectrometria de Massa)
IFTR	Espectroscopia de infravermelho
INT	Instituto Nacional de Tecnologia
ISO	International Organization for Standardization
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kg	Quilograma
M	Molar
m ³	Metro Cúbico
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (Matrix-assisted laser desorption/ionization)
Mbp	Milhões de pares de bases
MCT	Metil catecol
MCT	Ministério da Ciência e Tecnologia
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MME	Ministério do Meio Ambiente
mN m ⁻¹	MiliNewton por metro
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
NBR	Norma Brasileira aprovada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas
ng	Nanograma
NIST	National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia)
Nm	Nanômetro
OIT	Temperatura de indução de oxidação
P.A.	Para análise

pb	Pares de bases
PCA	Análise dos componentes principais (Estatística)
PCA	Plate Count Agar (Meio de Cultura para Contagem)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDMS	Polidimetilsiloxano
PG	Propil galato
Pid	Percentual de identidade de sequências
PNPB	Programa Nacional de Produção de Biodiesel
p-NPP- <i>p</i>	nitrofenilpalmitato
ppm	Parte por milhão
Pro biodiesel	Programa Brasileiro de Biodiesel
Pro óleo	Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos
PTFE	Politetrafluoretileno
PY	Pirogalol
qPCR	PCR quantitativo
R2A	Reasoner's 2A agar
rDNA	DNA ribossômico
RenovaBio	Política Nacional de Biocombustíveis no Brasil
RMN	Ressonance Magnetic Nuclear (Ressonância Magnética Nuclear)
Rpm	Rotações por minuto
SPME	Micro Extração em fase Sólida
T	Temperatura
TBC	Tert-butil catecol
TBHQ	Terc-butil hidroquinona
tep	Toneladas equivalentes de petróleo
TOF	Tempo de voo/ Time of flight
TSA	Tryptone Soy Agar (Agar Triptona de Soja)
UV	Ultravioleta
µL	Microlitro
µm	Micrometro

1 INTRODUÇÃO

O uso de combustíveis derivados do petróleo, como o diesel e a gasolina, tem sido a principal fonte energética mundial, no entanto alternativas menos impactantes e de natureza renovável, como os biocombustíveis, já se tornaram uma realidade. No Brasil, atualmente, o biodiesel é adicionado ao diesel (B10) em uma proporção de 10%, devido à determinação da lei nº. 13.623, de 2016, e a perspectiva no cenário nacional é de que este percentual aumente nos próximos anos.

A tecnologia para a produção de biodiesel predominante no mundo é a transesterificação, definida como a reação de um ácido graxo com um álcool, geralmente de cadeia curta (metílico ou etílico). A fonte de ácido graxo da reação de transesterificação pode ser proveniente de plantas oleaginosas, como soja, palma e amendoim, de gordura animal e também de óleos residuais. O biodiesel somente é liberado para o mercado após a realização de algumas análises especificadas pela Resolução da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) nº. 45, de agosto de 2014. Dentre essas análises estão o teor de éster, a viscosidade cinemática a 40 °C, a massa específica a 20 °C, o teor de água, o índice de acidez, a estabilidade à oxidação a 110 °C, etc. Os valores de cada análise devem estar de acordo com os limites impostos pelas normas previstas em lei, sendo essas características indispensáveis para que o biocombustível tenha o rendimento esperado no motor.

No cenário atual, segundo o anuário estatístico da ANP de 2017, a soja é a oleaginosa mais utilizada para a produção de biodiesel no Brasil, porém no cenário nacional também temos gordura animal e óleo de algodão entre outros materiais graxos. Dependendo da matéria prima utilizada na produção de biodiesel, ésteres com propriedades diferentes podem variar de concentrações e, conseqüentemente, alterar as características do biodiesel produzido. Ésteres saturados possuem maior número de cetano, parâmetro que mede a capacidade do combustível para a autoignição quando injetado no motor. Além disso, ésteres saturados são menos propensos à oxidação, porém acabam cristalizando e solidificando em temperaturas mais altas quando comparados a ésteres insaturados. O biodiesel pode solidificar-se parcialmente ou perder sua fluidez durante a exposição a temperaturas mais frias, levando à interrupção do fluxo do combustível, entupimento do sistema de filtros e

ocasionando problemas no motor. A utilização deste biocombustível em regiões de clima mais frio pode ser determinada por meio de alguns parâmetros: ponto de névoa, ponto de fluidez e ponto de entupimento de filtro a frio.

A fim de evitar as consequências relacionadas à solidificação do biodiesel em climas frios, o tratamento com aditivos químicos é uma prática estabelecida. Alguns aditivos melhoram as propriedades de fluidez a baixas temperaturas e, apesar de terem sido desenvolvidos para o uso em combustíveis fósseis, apresentam eficácia também em combustíveis alternativos à base de gordura animal. O uso de aditivos com capacidade antioxidante e anticongelante visam melhorar características do biodiesel durante a estocagem e são utilizados pela indústria, visto que, apesar dos óleos vegetais apresentarem componentes naturais com atividades antioxidantes, estes são perdidos na reação de produção do biodiesel. Os aditivos mais utilizados comercialmente possuem natureza sintética, no entanto, atualmente, há um apelo pela substituição por naturais provenientes de matérias primas renováveis.

Durante a estocagem de biodiesel puro ou em mistura com o diesel, é preciso considerar a suscetibilidade à degradação por microrganismos, processo também conhecido por biodeterioração. Devido à composição de ésteres de ácidos graxos, o biodiesel possui maior facilidade de ser reconhecido enzimaticamente pelos microrganismos, conferindo-lhe uma maior biodegradabilidade. O óleo diesel, cujos constituintes são basicamente hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e policíclicos aromáticos (HPAs), são comparativamente mais recalcitrantes à degradação no ambiente. Essa característica é considerada uma das vantagens do biodiesel ao diesel considerando-se acidentes ambientais com combustíveis. Porém, durante o armazenamento de combustíveis em condições inadequadas microrganismos podem desenvolver-se, formando uma massa biológica (lodo) no fundo dos tanques de estocagem.

Procedimentos conhecidos como “Boas Práticas” envolvem drenagens frequentes e eventuais limpezas dos tanques de armazenamento, podendo ser uma forma preventiva de controlar o crescimento microbiano. Com a introdução de biodiesel foi verificada uma maior suscetibilidade da nova mistura (diesel/biodiesel) à biodeterioração e à instabilidade química, o que leva a um aumento na geração de sedimentos de natureza biológica e/ou química, os quais, por sua vez, comprometem a qualidade final do produto armazenado. Nesse sentido, a comunidade usuária foi

alertada para a necessidade do estabelecimento de rotinas rígidas de manutenção no armazenamento, em especial das misturas diesel-biodiesel. O uso de biocidas com a função de preservação dos combustíveis em situações de armazenamento precárias ainda não foi examinado nem aprovado por órgãos ambientais brasileiros.

A proposta desta tese é avaliar o potencial deteriorogênico de comunidades microbianas presentes no biodiesel e no lodo encontrado no tanque de estocagem de uma usina de biodiesel, abordando aspectos relacionados à deterioração, degradação e possibilidade de identificação de moléculas naturais com potencial antimicrobiano para uso como aditivos em biodiesel.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade deteriorogênica de uma comunidade microbiana presente em amostras de biodiesel e de uma borra presente no fundo de um tanque de estocagem de uma usina produtora de biodiesel.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a composição química e microbiológica de uma borra coletada do fundo de um tanque de estocagem de biodiesel em uma usina produtora de biodiesel por meio de métodos químicos e microbiológicos.

Descrever o potencial deteriorogênico da levedura *Aureobasidium pullulans* LABBIO17 sobre biodiesel, diesel e sua mistura B20, determinando seu comportamento na presença de ésteres de ácidos graxos usando técnicas moleculares e microbiológicas clássicas.

Avaliar o impacto da concentração de água no biodiesel durante a estocagem com relação a propriedades físicas, químicas e microbiológicas com auxílio de métodos de química analítica, microbiológicos e por metagenômica (Illumina Mi-Seq).

Avaliar produtos naturais e sintéticos com potencial de uso como aditivos para biodiesel, como antimicrobianos diante de uma microbiota naturalmente presente em tanques de estocagem de biodiesel.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA

No Brasil, segundo o Balanço Energético Nacional, um aumento de 1,8% e 1,7% na produção e consumo, respectivamente, de energia não renovável e renovável foi registrado de 2016 para 2017 (MME, 2018). A matriz energética brasileira compreende fontes de energia não renováveis (petróleo e derivados, gás natural, carvão mineral, urânio) e renováveis (eletricidade hidráulica, solar, eólica, lenha e carvão vegetal, derivados da cana de açúcar), sendo que combustíveis líquidos (gasolina, óleo diesel, biodiesel, etanol e querosene de aviação) representaram 35,5% de todo o consumo energético final em 2017 (Pottmaier et al., 2013; MME, 2018). Mundialmente, fontes de energia renováveis são responsáveis por 10,4% da energia consumida, ao mesmo tempo que os combustíveis fósseis são responsáveis por 79,5%, sendo os 10% restantes divididos entre energia nuclear e de biomassa (REN21, 2018).

O Brasil ocupa o 7º lugar no ranking de consumidores de derivados de petróleo, totalizando 4.791 mil toneladas equivalentes de petróleo (tep) usadas em 2017 (MME, 2018; BP, 2018). No entanto, no campo de combustíveis provenientes de fontes alternativas, como o biodiesel e o etanol, o Brasil é o 2º país com maior produção e consumo, perdendo apenas para os Estados Unidos (REN21, 2018). A participação de biocombustíveis na matriz energética brasileira desponta de 1933, quando, no governo do presidente Getúlio Vargas, foi criado o Instituto do Açúcar e do Alcool e, por meio do decreto-lei nº. 737/1938, tornou-se obrigatória a mistura de etanol na gasolina (Pinho & Teixeira, 2015; Almeida et al., 2017).

Mais tarde, em 1975, a experiência do Brasil com o etanol intensificou-se com o Programa Proálcool, logo após a primeira crise do preço do petróleo em 1973. O programa Proálcool tinha o objetivo de diminuir a dependência das exportações do petróleo e oferecer uma alternativa à queda do preço do açúcar no mercado internacional. No entanto, em meados de 1990, com a queda do preço do petróleo e o aumento no preço do açúcar, os subsídios para produção do etanol diminuíram, causando uma escassez no produto (Santos et al., 2017). O programa foi retomado em 2003, aliado à queda do preço do açúcar e à introdução dos carros *flex-fuel*, para

suprir uma demanda mundial pela substituição das energias não renováveis por aquelas de fontes renováveis mais limpas (Távora, 2011; Almeida et al., 2017; Santos et al., 2017).

A trajetória do biodiesel no Brasil iniciou-se ainda em 1920, com iniciativas do Instituto Nacional de Tecnologia, no Rio de Janeiro, de aplicação de óleos vegetais, ainda na forma *in natura*, como combustível veicular (Távora, 2011; Parente Júnior, 2016). Entretanto, alguns problemas relacionados à alta viscosidade dos óleos vegetais foram sendo observados em motores de injeção direta, o que inviabilizou esse processo. Em decorrência disso, extensivos esforços foram feitos em relação à modificação química de óleos e gorduras, no intuito de superar esses empecilhos e possibilitar o uso dessa matéria prima renovável como combustível em motores do ciclo diesel (Parente Júnior, 2016).

Diante da necessidade de viabilizar um substituto natural ao diesel, uma proposta de destaque foi o Prodieisel, coordenado pelo pesquisador Exedito José de Sá Parente da Universidade Federal do Ceará ainda na década de 1970. O Prodieisel era composto por óleo vegetais modificados pela reação de transesterificação, com propriedades físico-químicas e poder calorífico semelhantes ao do óleo diesel mineral. Este óleo diesel vegetal, anos mais tarde, foi designado como biodiesel, sendo testado exaustivamente e promovendo a liberação da primeira patente brasileira (PI8007957), em 1983 (Parente Junior et al., 2016).

O Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (Proóleo) foi criado em 1975 com o intuito de promover inicialmente a substituição do óleo diesel mineral em 30%. Nesse plano de governo, foi proposta a transesterificação ou alcoólise de óleos e gorduras como alternativa aos óleos vegetais *in natura*, o que acabou gerando as primeiras patentes brasileiras de processos de transesterificação (Suarez & Meneghetti, 2007; Távora, 2011; Santos et al., 2017). O programa acabou sendo encerrado em 1986, para então ser retomado efetivamente em 2002 com a criação do Probiobiodiesel (Programa Brasileiro de Biodiesel) sob a coordenação do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) (Santos et al., 2017).

Em 2004, foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), uma releitura do Probiobiodiesel, cujos objetivos foram reduzir a dependência do petróleo; expandir os mercados das oleaginosas; impulsionar a demanda por combustíveis alternativos; reduzir a emissão de gases poluentes; e diversificar as

matérias-primas e as regiões produtoras, ampliando, assim, a produção e o consumo em escala comercial e de forma sustentável (Mattei, 2010; Santos et al., 2017; Sampaio & Bonacelli, 2018). Com a aprovação da lei nº. 11.097/2005 todo combustível diesel vendido no Brasil, com exceção do diesel marítimo, tem a adição de biodiesel na proporção fixada em lei. Atualmente essa proporção é de 10% e a previsão é que ela seja aumentada nos próximos anos (Knothe & Razon, 2017; CNPE, 2017).

Com o agravamento do aquecimento global, as emissões de gases do efeito estufa vêm sendo monitoradas e, sendo assim, o uso de biocombustíveis é amplamente incentivado, tendo como principal objetivo a diminuição da poluição atmosférica, a qual é responsável por danos à saúde humana e ao meio ambiente (Ramos et al., 2017; Oliveira & Coelho et al., 2017). Em 2017, o Brasil registrou uma participação baixa, de 1,4%, em todas as emissões de dióxido de carbono (CO₂) registradas (BP, 2018). Os maiores emissores, no mesmo período, foram os Estados Unidos (15,2%) e a China (27,6%), os quais ocupam o primeiro e segundo lugar dentre os maiores consumidores de derivados de petróleo (BP, 2018).

Em dezembro de 2017, a lei nº. 13.576 instituiu a Política Nacional de Biocombustíveis no Brasil (RenovaBio) com o intuito de aumentar a oferta de energia sustentável, impulsionando o desenvolvimento tecnológico com competitividade dos biocombustíveis e a inserção comercial e de novos biocombustíveis na matriz energética nacional.

Desta forma, é possível visualizar a participação de combustíveis renováveis no consumo de energia nacional. Em 2017, as fontes renováveis foram responsáveis por 43,2% de toda a energia consumida, em comparação aos não renováveis (56,8%) (MME, 2018). Na Oferta Interna de Energia (OIE), o agregado "Outras Renováveis", que compreende energia eólica, biodiesel, lixívia, biogás, resíduos de madeira, casca de arroz, capim elefante, dentre outros, teve uma alta, de 9,3% quando comparado a 2016, sustentada por fortes altas na geração eólica e na produção de biodiesel (MME, 2018). A produção de etanol apresentou uma queda de 2,1% em comparação a 2016 e a produção de biodiesel subiu 12,9% durante o mesmo período (MME, 2018; ANP, 2018).

3.2 BIODIESEL: PRODUÇÃO E PROPRIEDADES

Segundo a legislação brasileira, o biodiesel é definido como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa (ANP, 2014). Sua produção é realizada a partir de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal principalmente pelo processo de transesterificação, representado na Figura 1, por meio do qual uma fonte de material graxo reage com um álcool, sob a influência de catalisadores, gerando ésteres de ácidos graxos e glicerol (Ambat et al., 2018).

Após a produção é necessário que o biodiesel passe por um processo de purificação por meio do qual retiram-se os resíduos da reação, tais como o glicerol, restos de catalisador e ácidos graxos não esterificados, os quais, se não forem removidos, podem reagir e precipitar, formando depósitos e borras no fundo dos tanques de estocagem (Dunn, 2012; Pinho et al., 2016). Esse processo é considerado fundamental para que o biodiesel atinja no mínimo 96,5% de pureza de ésteres, um dos parâmetros de qualidade exigidos pela Resolução da ANP nº. 45, de 2014 (Lôbo et al., 2009; ANP, 2014; Ambat et al., 2018).

Para que o biodiesel possa ser comercializado, este e outros parâmetros devem estar em conformidade com os limites impostos pela Resolução ANP nº. 45. Teor de éster, viscosidade cinemática a 40 °C, massa específica a 20 °C, teor de água, índice de acidez e estabilidade à oxidação a 110 °C, entre outras características, possuem os limites preconizados em normas e resoluções governamentais. A emissão do certificado de qualidade permite a venda do biodiesel, o qual no prazo de 30 dias deve ser resubmetido a algumas análises no caso de sua não comercialização.

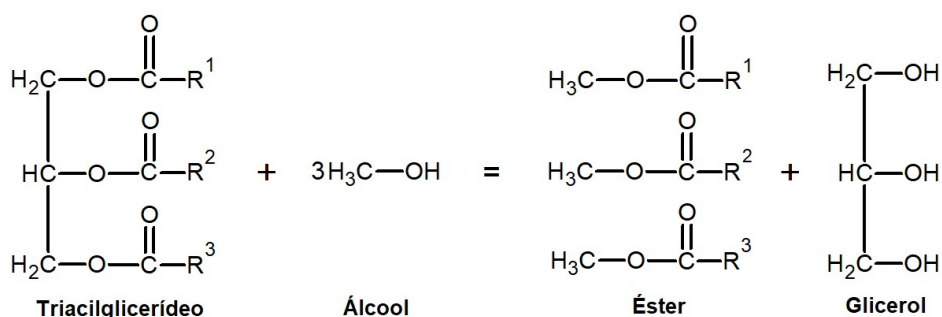


Figura 1 - Esquema da reação de transesterificação (ACD/ChemSketch).

O álcool mais utilizado na reação de transesterificação ainda é o metanol, já que este apresenta maior reatividade na reação e menor custo no mercado internacional, no entanto existe a inconveniência deste ser oriundo de fontes fósseis (Ramos et al., 2017). O etanol, obtido de fonte renovável, seria uma alternativa viável, porém o seu uso dificulta a separação das fases biodiesel-glicerina durante o processo de purificação, em adição ao baixo rendimento de ésteres da reação (Parente et al. 2003; Ramos et al., 2017).

Para que o álcool reaja com o óleo e o rendimento esperado da reação seja obtido são utilizados catalisadores, os quais aumentam a velocidade e eficiência da transesterificação. Diversos catalisadores com origem alcalina, ácida ou enzimática, e denominados homogêneos ou heterogêneos, podem ser indicados, contudo o uso destes depende da natureza dos óleos utilizados na reação (Macedo & Macedo, 2004; Ramos et al., 2017). Um exemplo disso é o metóxido de sódio (CH_3ONa), catalisador mais utilizado industrialmente, que exige o uso de óleos neutros, com baixo índice de acidez e baixa umidade para que evite a formação de sabões ou que o catalisador seja consumido na reação, desequilibrando a transesterificação (Tebas et al., 2017).

Como catalisadores alternativos há as resinas poliméricas de troca-iônica, membranas zeólitas, complexos metálicos, metais ativos em suportes sólidos, óxidos metálicos e enzimas do tipo lipases (Dabdoub et al., 2009; Tacias-Pascacio et al., 2018). Compostos organometálicos de estanho possuem ótimos resultados ao serem utilizados na transesterificação de óleo de soja (Meneghetti & Meneghetti, 2015). Abreu et al. (2005) observou o uso de compostos contendo estanho na produção de biodiesel, utilizando metanol como o álcool da reação, em sistema heterogêneo, com a vantagem de não haver formação de emulsões no final da reação. Neto et al. (2007) corroboraram a utilização de complexos de estanho como catalisadores e observaram, comparativamente, que a adição desses à reação aumentou copiosamente o rendimento.

Para cada 90 m³ de biodiesel produzidos pela transesterificação são gerados, aproximadamente, 10 m³ de glicerina. Desta forma, os derivados do glicerol são comumente utilizados como aditivos para combustíveis, fabricação de cosméticos, saboaria, fármacos, surfactantes, flavorizantes e solventes para uso na medicina (Mota et al., 2009; Mota & Pestana, 2011; Vignesh & Barik, 2019).

A fonte de ácido graxo da reação pode ser proveniente das mais variadas

matérias primas. Atualmente, a oleaginosa com maior destaque na produção de biodiesel brasileiro é a soja, sendo responsável por 71,6% do total (ANP, 2018). A capacidade de produção dessa matéria prima no território nacional é bem extensa, devido ao Brasil possuir mais de 30 anos de experiência no cultivo, sendo o segundo maior produtor mundial desse grão, perdendo apenas para os Estados Unidos (Martins & Carneiro, 2017). No entanto outras fontes graxas também fazem parte das matérias primas utilizadas na indústria de biodiesel, tais como gordura animal (16,8% do total), seguida por outros materiais graxos (11,6% do total) (ANP, 2018).

O Brasil é um país com uma vasta biodiversidade, sendo detentor de mais de 100 plantas oleaginosas elegíveis para a produção de biodiesel. Para que se tornem matérias primas do biodiesel essas fontes de ácidos graxos dependem de aspectos técnicos e da possibilidade da exploração comercial dos materiais graxos gerados a partir delas para propósitos energéticos, além de apresentarem uma viabilidade econômica para então ser possível diversificar a cadeia de produção desse biocombustível (Souza et al., 2017).

Durante o lançamento do Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB), em 2004, oleaginosas regionais, como a mamona (*Ricinus communis*) receberam especial atenção (Castro, 2011). Essa matéria prima, porém, acabou não acompanhando a demanda de produção de biodiesel, além de apresentar entre 80 e 90% de ácido ricinoléico, o qual confere uma viscosidade sete vezes maior que de outros óleos, inviabilizando seu uso na produção de biodiesel (Castro, 2011; Obermaier & La Rovere, 2012; Maia, 2012; Dias et al., 2013; Keera et al., 2018).

Mais recentemente, pesquisas em torno da produção de biodiesel a partir de óleo extraído de microalgas têm chamado a atenção do meio acadêmico (Menezes et al., 2013; González et al., 2015; Vignesh & Barik, 2019). Microalgas podem ser cultivadas em sistemas abertos ou reatores fechados com diferentes designs, sendo as microalgas mais cultivadas para esse fim pertencentes ao gênero *Chlorella* sp. (alga unicelular) (Pinho et al., 2017). Comparativamente à soja e outras oleaginosas, o cultivo de microalgas se mostra promissor porque, além de apresentar maior produtividade em óleo, exige menores extensões de terra para a sua produção (Franco et al., 2013; Ramos et al., 2017; Carneiro et al., 2018, Cruz et al., 2018). Menezes et al. (2013) encontraram um rendimento em óleo de 115% maior que a soja, sendo que o organismo do gênero *Choricystis* sp. apresentou o melhor resultado entre

as microalgas testadas. No entanto, o uso desses microrganismos como precursores da matéria prima para biodiesel possui alguns aspectos negativos. Há a possibilidade de contaminação por protozoários e zooplâncton em sistemas de tanques abertos; o alto custo de produção e baixo valor de revenda, além do crescimento das algas estar condicionado a condições ambientais, as quais são difíceis de serem controladas. Ademais, os óleos que elas produzem são poli-insaturados, com alto teor de água e ácidos graxos livres, característica que impede o seu uso direto em processos alcalinos tradicionais de produção de biodiesel e que aumenta a instabilidade durante o armazenamento do produto final (Suarez et al., 2009; Oliveira et al., 2014; Carneiro et al., 2018).

Cada matéria prima apresenta um perfil de ácidos graxos diferente, o qual, após a reação de transesterificação, transfere ao biodiesel propriedades ligadas à composição e forma estrutural de suas cadeias carbônicas (Ramos et al., 2009). Matérias primas com um perfil de ácidos graxos saturados tendem a cristalizar quando o biodiesel produzido passa por temperaturas mais baixas, além de apresentarem um maior número de cetano (Banković-Ilić et al., 2014; Vargas et al., 2017). No entanto, ésteres saturados são mais resistentes à oxidação, demonstrando certa estabilidade durante o armazenamento (Kumar, 2017).

Além de ésteres de ácidos graxos, outros compostos, tais como mono, di e triglicerídeos não esterificados, glicerina e outras impurezas podem ser encontrados no biodiesel após a produção. Entre eles estão os esteróis glicosídeos, lipídeos encontrados em óleos e gorduras, na ordem de ppm (partes por milhão). A presença de esteróis glicosídeos no biodiesel pode acelerar a precipitação de compostos insolúveis durante a estocagem do combustível, formando as borras observadas no lastro dos tanques (Bondioli et al, 2008; Issariyakul & Dalai, 2014; Plata et al., 2015).

A natureza do resíduo sólido em biodiesel foi relatada como sendo composta por ésteres de ácidos graxos, esteróis, esteril-ésteres, esteril-glicosídeos e esteril-glicosídeos esterificados, os quais foram identificados como indutores da formação de precipitados em biodiesel de origem vegetal (Bondioli et al., 2008; Fernandes et al., 2012; Cazarolli et al., 2018). O perfil de esteróis glicosídeos presentes nos precursores do biodiesel difere em estrutura e em proporção para cada óleo e gordura, característica que confere a essas substâncias a particularidade de "impressão digital" para a identificação da procedência de cada matéria prima

(Fernandes et al., 2012; Bezerra et al., 2015).

3.3 DEGRADAÇÃO ABIÓTICA

O biodiesel é considerado suscetível a processos de degradação abióticos, que compreendem processos químicos e físicos. Reações de natureza hidrolíticas e oxidativas são naturalmente induzidas durante a estocagem por fatores como calor, radiação UV, umidade, ar atmosférico e metais, formando radicais livres e liberando aldeídos, ácidos carboxílicos e polímeros (Karavalakis et al., 2011; Knothe & Razon, 2017).

Entre esses processos, um dos parâmetros mais importante para a determinação da qualidade do biodiesel é a estabilidade à oxidação, a qual pode ser definida pela resistência do combustível a alterações físico-químicas. Devido à sua composição química o biodiesel apresenta uma estabilidade à oxidação menor quando comparada ao combustível diesel, por exemplo (Yakoob et al., 2014; Ramos et al., 2017). Isso deve-se ao fato de que o diesel comercializado no Brasil apresenta um máximo de 10 ppm de enxofre previsto em lei, o qual é removido do diesel original por um processo denominado de hidrotreatamento (HDT). Durante esse processo, o diesel reage com hidrogênio sob altas temperaturas, procedimento que dá origem a um diesel com teor de enxofre reduzido e maior saturação da cadeia carbônica. Essa saturação é responsável pela estabilidade oxidativa do diesel (Carvalho et al., 2016).

A metodologia indicada pela Resolução ANP nº. 45/2014 para avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel é a EN 14112, a qual consiste em um teste de oxidação acelerado, realizado com auxílio do equipamento Rancimat (ANP, 2014; Ramos et al., 2017). A oxidação do biodiesel pode ocorrer de duas formas: auto oxidação e foto-oxidação. A auto oxidação é uma cadeia de eventos que, na presença de oxigênio, acabam gerando radicais peróxidos, hidro peróxidos e outros componentes mais estáveis. A degradação dos peróxidos resulta na formação de aldeídos, os quais são também sensíveis à oxidação, podendo levar à formação de um grande número de ácidos graxos com cadeias carbônicas reduzidas (Yakoob et al., 2014).

Enquanto a auto oxidação ocorre na presença de oxigênio, para a foto-oxidação ocorrer a presença de oxigênio e luz é necessária. A reação de foto-

oxidação, da mesma forma, resulta no surgimento de hidro peróxidos (Ferrari & Souza, 2009; Yakoob et al., 2014). Os compostos formados durante a oxidação do biodiesel, além de comprometerem a qualidade final do combustível, podem modificar o pH de um sistema de armazenamento devido ao seu caráter ácido, o qual acelera processos corrosivos nos tanques e instabilidade química dos combustíveis, causando depósitos no interior dos tanques e sistemas de transporte, armazenamento e abastecimento (Ambrozin et al., 2009; Ramos et al., 2017).

Na deterioração por reações oxidativas, o éster presente no biodiesel possui a tendência de hidrolisar-se na presença de ar, água ou oxigênio (Yakoob et al., 2014; Knothe & Razon, 2017). Reações hidrolíticas, catalisadas por enzimas ou pela ação de calor e umidade, resultam no aparecimento de ácidos graxos livres, os quais aumentam o índice de acidez do biodiesel, outro parâmetro de qualidade que possui um limite para a comercialização e definição da qualidade do combustível (Yakoob et al., 2014; Ramos et al., 2017).

Uma propriedade do biodiesel que poderia agravar essas reações deteriorogênicas é a sua grande afinidade com água, a qual se dá devido à presença de oxigênio em sua composição (Pinho et al., 2016). A água pode estar presente de três formas: emulsificada, produzida por microrganismos; dissolvida, em gotas suspensas no biocombustível; e, dependendo da quantidade, decantada no fundo do tanque de estocagem, como água livre, formando um lastro (Bento et al., 2016; Mahmudul et al., 2017).

Nesse sentido, com o intuito de evitar problemas associados à presença de água durante a estocagem a Resolução ANP nº. 45/2014 preconiza um limite em 200 mg Kg⁻¹ de água logo após a produção (ANP, 2014). As metodologias exigidas para a determinação desse parâmetro pela Resolução são as ASTM D6304 e a EN ISO 12937. Ambas são baseadas no método de Karl Fischer coulométrico, o qual é um dos métodos de titulação mais frequentemente utilizado e é usado para a determinação de conteúdo de água para uma ampla variedade de aplicações e amostras (Bruttel & Schlink, 2003).

3.4 DEGRADAÇÃO BIÓTICA

O biodiesel é suscetível à processos de degradação mediados por microrganismos. A presença de água é considerada imprescindível para que a microbiota presente naturalmente em sistemas de estocagem possa crescer e comprometer a qualidade do combustível durante o armazenamento (Gaylarde et al., 1999; Hill & Hill 2009; Soriano et al., 2015; Passman, 2013; Bento et al., 2016; Cavalcanti et al., 2019). Quando ocorre um comprometimento da estabilidade no armazenamento do combustível por ação da atividade microbiana, denomina-se o processo de biodeterioração (Passman, 2013). Neste sentido, Passman e Dobranick, em 2005, alertaram para o fato que a adição de biodiesel poderia ser uma vantagem, no caso de um acidente ambiental, e também um problema ou desvantagem, devido ao seu armazenamento.

O crescimento microbiano às expensas do carbono presente em derivados de petróleo é de conhecimento desde 1895, quando Miyoshe detectou o crescimento do fungo *Bothritis cinerea* em finas camadas de parafina (Miyoshe, 1895). No entanto, os problemas associados ao desenvolvimento de microrganismos somente passaram a chamar atenção quando a Força Aérea dos Estados Unidos encontrou uma grande contaminação do combustível de aviação JP-4, em 1950 (Dodos et al., 2012). No Brasil, o primeiro estudo avaliando a presença de microrganismos em tanques de estocagem foi em querosene de aviação, realizado por Gutheil (1966) por meio do isolamento do fungo *Cladosporium resinae*.

Os primeiros trabalhos avaliando a suscetibilidade do biodiesel ao crescimento e degradação por microrganismos são datados de 1998. Zhang et al. (1998) observaram a degradação do biodiesel na presença de água do mar e determinaram as taxas de máxima mineralização (degradação completa) de 25 mg L⁻¹ dia⁻¹ para o biodiesel produzido a partir de óleo de colza, enquanto para o diesel esse valor foi de 12,5 mg L⁻¹ dia⁻¹.

No Brasil, os primeiros estudos sobre a estabilidade (biótica e abiótica) do biodiesel começaram em 2006. Vieira et al. (2006) detectaram altas porcentagens de degradação de biodiesel de óleo de palma e acúmulo de ácidos graxos livres (aumento da acidez no Biodiesel), devido a bactérias deteriogênicas. Bento et al. (2006) avaliaram a suscetibilidade da introdução de biodiesel ao diesel metropolitano (com

no máximo 50 ppm de enxofre) com relação à produção de biomassa e observaram um aumento significativo no desenvolvimento da comunidade microbiana na interface óleo/água de um armazenamento simulado em laboratório em diferentes escalas.

O impacto da adição de biodiesel ao óleo diesel já foi avaliado por vários autores em vários países (Passman & Dobranick, 2005; Pasqualino et al., 2006; Owsianiak et al., 2009; Schleicher et al., 2009; Bücken et al., 2011; Soriano et al., 2015). Pasqualino et al. (2006) observaram que quanto maior a adição de biodiesel na mistura menor o tempo necessário para se atingir 50% de biodegradação. Owsianiak et al. (2009) confirmaram a preferência de consumo dos ésteres de ácidos graxos pela população microbiana. Silva et al. (2012) acompanharam a degradação de várias misturas (B5, B20, B50 e B100) e o aumento da degradação dos contaminantes a partir da utilização da mistura B20 até a B100 foi observado. Bücken et al. (2011) observaram o aumento da biodegradação do combustível diesel à medida que biodiesel era adicionado à mistura em concentrações crescentes. Soriano et al. (2015) observaram uma mudança no perfil da comunidade microbiana em amostras contendo mais de 20% de biodiesel, sendo sugerido que a disponibilidade de biodiesel no meio favoreceu o crescimento de novos microrganismos, o que seria um fator a ser considerado no caso da comercialização de misturas de diesel com porcentagens maiores de biodiesel.

Durante a estocagem do biodiesel, reações de deterioração são reconhecidamente esperadas, na medida que a composição intrínseca dos ésteres de ácidos graxos facilita o crescimento de microrganismos. As reações de oxidação e hidrólise são facilitadas também, configurando uma maior instabilidade química (Pasqualino et al., 2006; DeMello et al., 2007; Zuniga et al., 2011; Bücken et al., 2011; Dodos et al., 2012; Ng et al., 2015; Tsesmeli et al., 2017). Alguns trabalhos investigaram o impacto que a redução de enxofre do óleo diesel puro e a adição de biodiesel causaria às novas misturas (Dodos et al., 2012; Lyles et al., 2013; Azambuja et al., 2017). Para testar a hipótese de que a redução do teor de enxofre no óleo diesel não provocaria um maior desenvolvimento microbiano foram conduzidos ensaios de crescimento, avaliando-se a produção de biomassa em diesel com alto e baixo teor de enxofre, sendo observado que os maiores valores foram encontrados no diesel com 1.800 ppm de enxofre (Azambuja, 2016).

Existe uma vasta literatura abordando estudos e avaliações sobre o

crescimento microbiano e as consequências deste durante o armazenamento de combustíveis. Estudos têm focado na composição das comunidades microbianas e nas competências destas na produção de enzimas e detecção de metabólitos dos mais diversos, como os biossurfactantes, na presença de hidrocarbonetos presentes nos combustíveis (Gaylarde et al., 1999; Dodos et al., 2012; Allsopp et al., 2016; Bücker et al., 2018; Passman et al., 2018).

A biodegradação de hidrocarbonetos envolve uma série de etapas, as quais são mediadas por diferentes enzimas microbianas. Para que esses processos deteriogênicos ocorram, os hidrocarbonetos e/ou outros compostos presentes nos combustíveis precisam estar disponíveis, conseguindo, assim, os microrganismos transformar as moléculas presentes nos combustíveis em intermediários comuns que possam ser utilizados em suas rotas catabólicas (Van Hamme et al., 2003; Bento et al., 2016; Varjani, 2017; Lofthus et al., 2018).

As primeiras fases da degradação dos hidrocarbonetos são reações de oxidação que acabam gerando álcoois, aldeídos e, por último, ácidos graxos, os quais são posteriormente metabolizados por β -oxidação ou utilizados pela célula microbiana por meio de outras rotas metabólicas (Bento et al., 2005; Varjani, 2017). Para o biodiesel, a rota utilizada para a biodegradação consiste inicialmente da oxidação e hidrólise do metil ou etil éster por enzimas (esterase ou lipase) que produzem ácido graxo e um álcool (Figura 2) (Jakeria et al., 2014).

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases, as quais catalisam reações de hidrólise, síntese, trans- e intersterificação de vários compostos (Ribeiro et al., 2011). Destacam-se pela estabilidade em solventes orgânicos, pela alta especificidade, pelo substrato e pela ausência de cofatores para que a reação ocorra (Suzuki et al., 2004; Hasan et al., 2006; Tsai, 2016). Essas enzimas são ativas em substratos insolúveis, apresentando uma ativação interfacial típica, principalmente em triglicerídeos de cadeia longa. A esterase, outra hidrolase, no entanto, possui a capacidade de atuar em substratos solúveis, ésteres simples de cadeia curta (Jaeger et al., 1999; Lopes et al., 2011; Ribeiro et al., 2011).

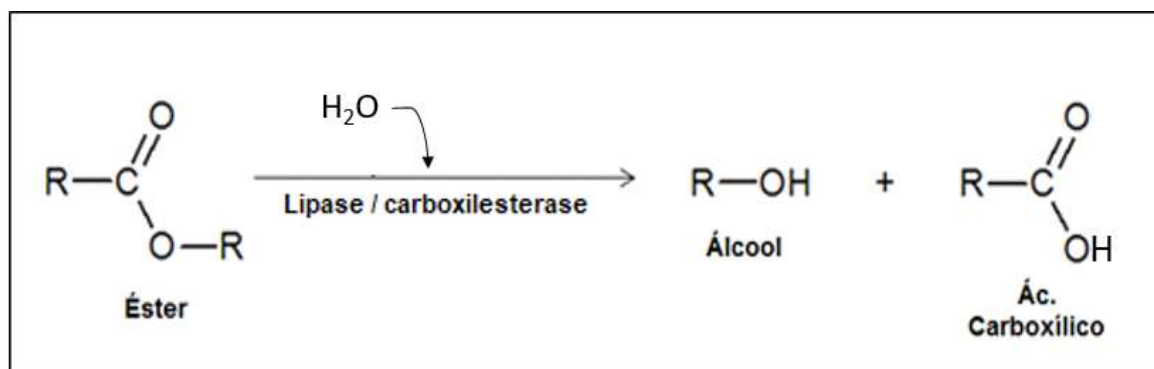


Figura 2 - Processo de hidrólise da ligação éster catalisada pelas enzimas lipases ou carboxilesterases. Fonte: Baseada em Santos, 2009.

A capacidade microbiana de crescer às expensas de combustíveis envolve estratégias como (1) a utilização direta ou indireta dos hidrocarbonetos para o metabolismo microbiano, que resulta em aumento de biomassa e perda da qualidade do produto, (2) a degradação de aditivos, que podem ser utilizados como nutrientes facilitadores da incorporação do carbono presente no combustível no crescimento de bactérias e fungos, e (3) a formação de produtos metabólicos, os quais, com características ácidas, podem gerar um ambiente propício para a corrosão de metais presentes nos tanques de estocagem (Bücker et al., 2011; Cazarolli et al., 2014; Allsopp et al., 2016; Azambuja et al., 2017; Bücker et al., 2018).

Os combustíveis provenientes da destilação fracionada do petróleo cru são degradados por bactérias e fungos presentes no ambiente. O óleo cru é uma mistura complexa de compostos alifáticos de cadeia aberta, cíclicos, compostos aromáticos e heterocíclicos (Allsopp et al., 2016; Varjani, 2017). Os produtos fracionados (gasolina, óleo diesel, parafina...) também possuem em suas constituições misturas de hidrocarbonetos, diferindo no tamanho das cadeias de carbono, e de considerável recalcitrância no ambiente (Speight et al., 2014; Allsopp et al., 2016). Os produtos químicos utilizados como aditivos, como aminas e fenóis aromáticos, agentes quelantes, álcoois e surfactantes, estabilizam o combustível, evitam processos de corrosão e previnem o congelamento (Allsopp et al., 2016; Hosseinzadeh-Bandbafha et al., 2018).

Algumas modificações químicas na estrutura dos combustíveis fósseis vêm sendo realizadas visando a redução de gases e emissão de poluentes. A redução de enxofre e chumbo nos processos de obtenção de combustíveis fósseis e a adição de biocombustíveis, como o biodiesel e o etanol, são estratégias utilizadas para que os

impactos ambientais sejam diminuídos (Song, 2003; Allsopp et al., 2016; Saavedra et al., 2018).

O inventariamento das comunidades microbianas, seja por meio de abordagens clássicas, com isolamento e identificação de espécies, ou de métodos mais robustos, como sequenciamento de alto rendimento (plataformas Illumina e Ion Torrent, por exemplo), geram resultados sobre o potencial de microrganismos crescer às expensas do carbono presente em combustíveis fósseis e biocombustíveis. De posse do conhecimento da composição da comunidade deteriorogênica é possível, então, estabelecer medidas de prevenção para aumentar a vida de prateleira dos combustíveis.

3.5 PROPRIEDADES E USO DE ADITIVOS

Um aditivo com potencial de uso para aumentar a estabilidade à oxidação e com potencial antimicrobiano atende ao conceito de aditivo multifuncional. Existe, no mercado brasileiro, um aditivo multifuncional para uso em óleo diesel e biodiesel que foi avaliado em vários trabalhos (Bücker et al., 2011, Zimmer et al., 2013; Bücker et al., 2014; Cazarolli et al., 2014; Zimmer et al., 2017; Da Fonseca et al., 2019). Foram realizados ensaios em escala laboratorial e piloto e com diferentes concentrações do ativo caracterizado, como uma oxazolidina, responsável por eliminar os microrganismos do sistema (Zimmer et al., 2013; Zimmer et al., 2017). No entanto, também foi verificado que subdoses podem ainda promover resistência das populações microbianas e que os demais compostos presentes no aditivo podem dar um suporte extra de nutrientes ao crescimento microbiano (Bücker et al., 2014).

As propriedades e características dos combustíveis estão intimamente ligadas à sua composição química (Lôbo et al., 2009; Pinho et al., 2016; Ramos et al., 2017). Dependendo do formato de suas cadeias carbônicas o combustível pode apresentar maior ou menor suscetibilidade às reações de deterioração durante o armazenamento. Algumas medidas podem ser tomadas para aumentar a resistência e o rendimento esperado pelo combustível no motor (Domingos et al., 2007; Knothe, 2007; Ferrari & Souza, 2009). O uso de aditivos pode ser uma forma de superar essas características intrínsecas aos combustíveis, prevenindo reações de degradação e melhorando as propriedades destes durante a estocagem. A utilização de aditivos é

prevista na Resolução ANP nº. 45, de 2014, tendo um limite máximo de uso de 5.000 ppm.

Particularmente para combustíveis, os aditivos utilizados atualmente possuem atributos que auxiliam algumas propriedades, tais quais antioxidantes, anticongelantes, anticorrosivos, melhoradores de combustão, melhoradores de lubrificidade e antimicrobianos, podendo ser usados tanto para combustíveis fósseis (diesel e gasolina) quanto para biocombustíveis e suas misturas (Ribeiro et al., 2007; Passman, 2013; Beck et al., 2014).

Uma característica peculiar do biodiesel é a sua utilização durante a exposição a temperaturas mais baixas. As propriedades de fluxo a frio, as quais já possuem alguns aditivos poliméricos indicados para retardar processos de congelamento e cristalização, são importantes para que o biocombustível apresente o rendimento esperado no motor (aditivos anticongelantes) (Cavalcanti et al., 2016).

Substâncias lipídicas, como o biodiesel, são muito sensíveis a reações de oxidação durante o armazenamento. Sendo assim, aditivos antioxidantes são comumente utilizados para que o biodiesel produzido atinja o nível de estabilidade necessário para sua comercialização, segundo limites propostos por Resoluções da ANP (Cavalcanti et al., 2016). Alguns antioxidantes estão disponíveis comercialmente, como, por exemplo, pirogalol (PY), ácido gálico (GA), propil galato (PG), butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA) e terc-butil hidroquinona (TBHQ) e são amplamente recomendados (Jain & Sharma, 2010; Kleinberg et al., 2017).

O uso de aditivos sintéticos torna a utilização de biodiesel cada vez mais dependente da indústria química. Como alternativa a esses aditivos de natureza sintética algumas opções renováveis são também incentivadas e estão sendo exploradas pela literatura (Kleinberg et al., 2017; Agarwal et al., 2018; Borugadda et al., 2018). Entre esses antioxidantes, temos, por exemplo, o cardanol (extraído do líquido da castanha de caju) e o eugenol (extraído do cravo da Índia), os quais têm sido foco de importantes trabalhos sobre avaliação de antioxidantes para biodiesel (Cavalcanti et al., 2016).

Canakci et al. (1999) apresentaram o primeiro trabalho com resultados do uso do butil hidroquinona terciária (TBHQ) em amostras de biodiesel preparadas a partir de óleo de canola, de milho, de girassol, de cártamo e de soja. Naquele estudo os autores observaram que a eficácia do antioxidante foi dependente da temperatura,

sendo que as amostras conservadas a 20 °C apresentaram melhores resultados de estabilidade oxidativa. Apenas três anos depois Dunn (2002) foi o pioneiro a avaliar a eficácia de um α – tocoferol (natural) adicionado ao biodiesel quando comparado ao TBHQ (sintético). Nesta avaliação observaram-se resultados similares para ambos os antioxidantes.

Aditivos antioxidantes naturais podem melhorar a estabilidade à oxidação, no entanto ainda não são muito utilizados na prática devido ao seu rendimento ser menor quando comparado com o de aditivos sintéticos (Sousa et al., 2014; Balaji & Cheralathan, 2015). Dentre os aditivos antioxidantes naturais mais estudados podem ser citados tocoferóis, ácidos fenólicos, flavonóides, ácido ascórbico, carotenos e demais extratos de plantas que são considerados prontamente biodegradáveis e não tóxicos (Oliveira et al., 2014; Sousa et al., 2014). No Brasil, muitas são as pesquisas cujos resultados se mostram promissores na utilização de alguns elementos renováveis como aditivos em diesel e biodiesel. Na Tabela 1, pode-se observar alguns extratos vegetais testados, como buriti, manjeriço, chá verde, tanino de acácia negra, caroço de abacate e alecrim (Bastos et al., 2013; Ferraz et al., 2016; Mori et al., 2016; Ribeiro et al., 2016).

Tabela 1 - Compostos avaliados no Brasil com capacidades de uso como aditivos de diesel e biodiesel.

Produto Testado	Propriedades testadas	Combustível testado	Autores
Sementes de <i>Moringa oleifera</i>	Antioxidante	Biodiesel de soja	Andrade et al., 2016
Ésteres poliméricos derivados de anidrido maleico e diferentes comonômeros	Anticongelante	Biodiesel de soja	Baena et al., 2016
Limoneno, etilenoglicol, tween 80 e álcool isoamílico	Anticongelante	Biodiesel de soja	Balen et al., 2014
Casca de buriti e folhas de manjeriço	Antioxidante	Biodiesel de soja	Bastos et al., 2013
Folhas de Alecrim	Antioxidante e antimicrobiana	Biodiesel de soja	Beker et al., 2016
Estanho	Antimicrobiano	Biodiesel de soja	Beker et al., 2016

Produto Testado	Propriedades testadas	Combustível testado	Autores
Derivados de metacrilato de dodecila	Anticongelante	Biodiesel de soja e diesel S10	Bonaroski et al., 2016
Cafeína, L-triptofano e curcumina	Antioxidante	Biodiesel de óleo de fritura	Carrim et al., 2016
Curcumina	Antioxidante	Biodiesel de girassol, soja, canola, milho, babaçu e sebo bovino	Castro, 2013
Alquil-fenóis	Antimicrobiano	Biodiesel de soja	Cazarolli et al., 2016
Ácido caféico e ácido ferúlico	Antioxidantes	Biodiesel de soja	Damasceno et al., 2013
α -tocoferol e TBHQ	Antioxidante	Biodiesel de soja	Dunn, 2002
Líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio	Antimicrobiano	-	Dutra et al., 2016
Eugenol	Antioxidante e propriedades térmicas	Biodiesel de soja	Feitosa et al., 2016
Própolis	Antioxidante	Biodiesel de soja	Fernades et al., 2016
Copolímeros de undecenoato de alquila	Anticongelante	Biodiesel de soja	Ferraz et al., 2016
Caroço de abacate	Antioxidante	Biodiesel de soja	Ferraz et al., 2016
Triton X100 e etilenoglicol P.A.	Anticongelante	Biodiesel de sebo	Fortunato et al., 2016
BHT	Antioxidante	Biodiesel de soja	Guerrero et al., 2016
BHA, BHT, PG, PY		Biodiesel de soja	Harter et al., 2016
BHT, BHA e TBHQ	Antioxidante	Biodiesel de sebo bovino	Kleinberg et al., 2016
Folhas de Chá verde	Anticorrosão	-	Lima et al., 2016
3,4-diaminotolueno (DAT), 1,2 diaminobenzeno (DAB), difenilamina (DIF), Nfenil-P-fenilenodiamino (DNP) e N-fenil-Ofenilenodiamino (DNO), ácido ferúlico, ferulato de metila	Antioxidante	Biodiesel de algodão	Maciel et al., 2016

Produto Testado	Propriedades testadas	Combustível testado	Autores
Formaldeído P.A; brometo de cetiltrimetilamonio; glutaraldeído grau I (70% em água); 2-metil-4-isotiazolin-3-one (95%)	Antimicrobiano	-	Marques Jr. e Antoniosi Filho, 2016
Limoneno, terebentina, X1200 e cânfora	Anticongelante	Biodiesel de soja, canola, milho, girassol e gordura suína.	Mattos, 2012
Folhas de alecrim	Antioxidante	Biodiesel de algodão	Medeiros, 2013
Folhas de chá verde e tanino de acácia negra	Antioxidante	Biodiesel de soja	Mori et al., 2016
Alquil-fenóis	Antioxidante	Biodiesel de canola	Muniz-Wypych et al., 2016
Aditivos fenólicos derivados de oleato de metila	Antioxidante	-	Muniz-Wypych et al., 2016
Polimetacrilatos	Anticongelante	Biodiesel de soja	Muniz-Wypych et al., 2016
HQ, CT e TBHQ	Antioxidante	Biodiesel de canola	Muniz-Wypych et al., 2016
Folhas de acerola, graviola, manga e pitanga	Antioxidante e propriedades térmicas	Biodiesel de soja e de sebo Bovino	Neuana, 2016
Folhas de hortelã, alecrim, erva-mate, óleo de candeia e o saburá, BHT e TBHQ	Antioxidante	Biodiesel de soja	Oliveira et al., 2014
Folhas de alecrim e TBHQ	Antioxidante	Biodiesel de algodão	Ribeiro et al., 2016
Alquilamino naftoquinona	Antioxidante e antimicrobiana	Biodiesel de soja	Rocha et al., 2016
Sementes de mostarda marrom	Antioxidante	Biodiesel de soja	Santos et al., 2016
Derivados de ácido acrílico e metacrilatos	Anticongelante	Biodiesel de soja	Silva et al., 2016
Folhas de alecrim, sementes de cravo-da-índia e açafreão-da-terra	Anticorrosão	Biodiesel de soja	Silva et al., 2016
Folhas de nim e maracujá	Antioxidante	-	Silva et al., 2016
Própolis e pólen	Antioxidante	Biodiesel de soja	Soares et al., 2016
Modificação química de óleo vegetal com hidroquinona	Antioxidante	-	Vieira et al., 2016

Produto Testado	Propriedades testadas	Combustível testado	Autores
Folhas e galhos secos triturados de alecrim, orégano e manjeriço	Antioxidante	Biodiesel de soja	Spacino et al., 2016

Mori et al. (2016) obteve resultados referente ao uso de chá verde e tanino de acácia negra quanto à estabilidade oxidativa do biodiesel e observou a seguinte sequência de efetividade TBHQ>Extrato de chá verde>BHT>Extrato de tanino. Assim como o chá verde, o caroço de abacate e o extrato de alecrim também mostraram resultados promissores quanto à atividade antioxidante sobre o biodiesel (Ferraz et al., 2016; Ribeiro et al., 2016).

Alecrim, orégano, manjeriço e outros extratos vegetais apresentam em sua composição compostos fenólicos que possuem a capacidade de neutralizar processos de oxidação (Wojdyło et al., 2007; Justo et al., 2008; Spacino et al., 2016). Spacino et al. (2016) observaram a ação antioxidante de extratos dessas plantas e chegaram a resultados promissores da ação conjunta de um extrato binário de alecrim e orégano. Sousa et al. (2014) avaliaram concentrações crescentes de curcumina e β -caroteno na estabilidade de um biodiesel de soja e observaram, por meio de dois métodos de avaliação da resistência à oxidação (Rancimat e Petro-OXY), que os melhores resultados foram obtidos para curcumina isolada em todas as concentrações testadas (500 a 1.500 ppm).

Na medida em que compostos sintéticos e extratos naturais são testados quanto à possibilidade de uso em combustíveis, especificamente quanto ao aumento da estabilidade, a oxidação com biodiesel e a função como antimicrobiano também têm sido o foco de vários trabalhos (Beker et al., 2016; Dodos et al., 2017; Costa et al., 2018). Beker et al. (2016) observaram a ação de um bio-óleo produzido a partir de óleo de soja, grãos de café e serragem de eucalipto, o qual apresentou, dependendo do microrganismo alvo, inibição no crescimento microbiano quando da aplicação de 0,25 a 4% de bio-óleo à mistura B10. Segundo os autores, a biomassa lignocelulolítica consiste em uma fonte natural capaz de diversificar recursos energéticos, sendo todo o material orgânico energia em potencial.

O bio-óleo, por sua vez, é caracterizado como um líquido escuro e viscoso resultante da pirólise de biomassa vegetais, o qual pode ter variação em ambas suas

composições químicas e físicas, dependendo do tecido vegetal utilizado, do método de preparação e da idade da amostra (Beker et al., 2016; Sharifzadeh et al., 2019). O bio-óleo é basicamente composto por hidrocarbonetos variados, os quais compreendem cadeias alifáticas e aromáticas, comumente na forma de fenóis e compostos furânicos (Sharifzadeh et al., 2019). Na indústria de combustíveis, o bio-óleo produzido a partir das mais variadas biomassas vegetais tem mostrado capacidade de ser transformado em combustível usando vários processos e condições de reação (Isa & Ganda, 2018).

Os fenóis fazem parte da composição dos aditivos mais citados na literatura utilizados para prevenir a oxidação do biodiesel (Medeiros et al., 2014; Nimse & Pal, 2015), além do potencial de ação antimicrobiano bem descrito (Daglia, 2012; Chaaban et al., 2018). Nesse sentido, o bio-óleo, composto majoritariamente por fenóis, apresentaria as condições necessárias para que fosse usado como um aditivo antioxidante e antimicrobiano de combustíveis.

Por outro lado, modificações químicas nos próprios ésteres do biodiesel vêm chamando atenção quanto à possibilidade do uso destes como aditivos, tendo, junto ao biodiesel, a capacidade de inibir alguns microrganismos (Oliveira et al., 2017; Costa et al., 2018). Costa et al. (2018) avaliaram diferentes aditivos preparados a partir de óleo de soja e etilenoglicol e observaram que uma mistura de nitratos de ésteres de etilenoglicol de soja foi ativo contra duas espécies de fungos filamentosos testados. Muniz-Wypych (2016) ligou covalentemente compostos fenólicos aos compostos graxos insaturados do biodiesel e obteve resultados promissores quanto às propriedades antioxidantes e anticongelantes. No entanto, quando a atividade antimicrobiana foi testada estes não apresentaram capacidade de eliminar a população microbiana nativa de biodiesel (Cazarolli et al., 2016).

Algumas moléculas sintéticas, conhecidas como biocidas, são utilizadas com ações previstas de inibição e/ou eliminação do crescimento microbiano em combustíveis armazenados. Entre elas pode-se citar isotiazolonas, aldeídos, oxazolidinas, hexahidrotiazinas e imidazóis (Gaylarde et al., 1999; Rajasekar et al., 2012; Raikos et al., 2012, Passman, 2013; Zimmer et al., 2017).

Um dos primeiros trabalhos com biocidas em combustíveis foi conduzido no querosene de aviação por Crane & Sanders, em 1967. Os autores avaliaram o biocida Biobor JF, cuja molécula principal é um dioxaborano (95%), e observaram a

inibição do crescimento de microrganismos (Crane & Sanders, 1967; Hill & Hill, 2008).

O maior número de trabalhos que avaliam a inibição de microrganismos com biocidas em sistemas com combustível são conduzidos com óleo diesel e misturas com biodiesel (Bücker et al., 2011; Zimmer et al., 2013; Zimmer et al., 2017; Luz et al., 2018; Da Fonseca et al., 2019). Este fato deve-se ao problema crônico que o óleo diesel tem com contaminação microbiana durante o armazenamento, o qual é potencializado pela adição do biodiesel às misturas (Bento & Gaylarde, 1996; Pasqualino et al., 2006; Bücker et al. 2011; Zimmer et al., 2013; Luz et al., 2018).

Os antimicrobianos, de uma maneira geral, são classificados em duas categorias de acordo com seu modo de ação: oxidantes e não oxidantes. O modo primário de ação dos antimicrobianos oxidantes consiste em interagir diretamente com os constituintes das células microbianas, sendo, conseqüentemente, efetivos contra quase todos os tipos de microrganismos. Os antimicrobianos não-oxidantes exercem atividade antimicrobiana, atuando sobre o metabolismo e/ou pela desintegração da parede celular, inibindo enzimas ou desnaturando proteínas (Gaylarde, 1995; Russel, 2003; Myers, 2008; Passman, 2013).

As características de um antimicrobiano ideal para uso em combustíveis incluem: ser seletivo sobre os microrganismos a eliminar; não ser corrosivo ao sistema; ter capacidade de manter o efeito inibidor na presença de outras substâncias; apresentar propriedades de biodegradabilidade; e, principalmente, ter baixo custo (Gaylarde et al., 1999; Passman, 2000; Yemanshova et al., 2007; Klinksporn, 2009; Zimmer et al., 2011; Passman, 2013; Bento et al., 2016).

Entre as avaliações conduzidas para conhecer o potencial antimicrobiano de um dado composto, tem-se a determinação das concentrações mínima inibitória e mínima biocida, a qual é uma avaliação orientativa do espectro do produto conduzida em condições ideais e padronizada. A Norma ASTM E1259 é recomendada para avaliar a efetividade de moléculas sintéticas e/ou naturais com microrganismos isolados (fungos filamentosos, leveduriformes e bactérias) ou com um consórcio não caracterizado, prevendo a proteção da deterioração microbiana de combustíveis líquidos. Essa Norma propõe a possibilidade do uso de microrganismos não identificados como inóculo, prospectados originalmente do lodo que se forma nos tanques. Neste sentido, trata-se de uma grande vantagem na medida em que muitos trabalhos que testam as propriedades antimicrobianas de algumas substâncias

envolvem espécies padrão (ATCC) de importância médica e podem não refletir o potencial de sensibilidade e/ou resistência da comunidade microbiana nativa a ser tratada.

Os problemas decorrentes da adição de biodiesel ao diesel são reconhecidos desde a última década. Esses têm com consequências diretas na qualidade final da mistura e os aditivos podem ser uma alternativa para estender a vida de prateleira desses combustíveis, visando garantir a qualidade e evitar os problemas associados a situações de armazenamento precárias.

4 PUBLICAÇÃO 1: CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL INSOLÚVEL ENCONTRADO NO FUNDO DE TANQUES DE ESTOCAGEM DE BIODIESEL DE SOJA

Autores: Juciana Clarice Cazarolli^a, Gabriela Boelter^a, Amanda Domingues^a, Thaisa Hengles^b, Maria do Carmo Ruaro Peralba^b, Camila Correa^b, Marco Flores Ferrão^{b*}, Eduardo Homem de Siqueira Cavalcanti^c, Marcia Veroneze Bisol^d, Kelly da Silva Bezerra^e, Nelson Roberto Antoniosi Filho^e; Fátima Menezes Bento^a

^a Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, N° 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, n° 9500, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

^c Divisão de Corrosão e Degradação, Instituto Nacional de Tecnologia. Av. Venezuela, n° 82, Sala 608, CEP: 200081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

^d 3 Tentos/RS. BR 285, KM 461,5, Distrito Industrial, CEP: 98.700-000, Ijuí – RS, Brasil.

^e Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES), Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, C.P. 131, CEP 74001-970, Goiânia-GO, Brasil

4.1 RESUMO

Durante o armazenamento de biodiesel podem ocorrer reações químicas com formação de precipitados e borras. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição química e microbiana de uma borra encontrada em um tanque de armazenamento de biodiesel. A borra foi coletada em uma planta de produção de biodiesel. O estudo da composição química foi realizado por meio de espectroscopia de infravermelho (IFTR), espectroscopia de absorção atômica de chama (FAAS), cromatografia em fase gasosa (GC), já a avaliação microbiana utilizou técnicas dependentes de cultivo microbiano. O potencial deteriogênico da comunidade microbiana nativa foi avaliado usando a borra como um inóculo microbiano em um experimento durante 60 dias. O crescimento microbiano, a degradação do biodiesel, as alterações de pH e a detecção de ésteres na fase aquosa foram avaliados. A análise química indicou que a composição da borra é de ésteres de ácidos graxos e íons metálicos, não sendo detectados esteróis glicosídeos. Sete bactérias e cinco fungos foram isolados da borra. Os resultados do crescimento indicaram que a comunidade microbiana nativa não possui uma alta capacidade deteriogênica no biodiesel.

Palavras-chave: biodiesel, borra, microrganismos, biodeterioração, infravermelho.

4.2 INTRODUÇÃO

O uso de biocombustíveis derivados de matéria prima renovável tem sido cada vez mais comum no campo energético mundial. No Brasil, com a aprovação da lei nº. 11.097, de 13 de janeiro de 2005, o biodiesel passou a ser adicionado ao diesel de petróleo. Atualmente, a concentração é de 10% (B10), mas a perspectiva é que essa proporção aumente nos próximos anos. A produção nacional de biodiesel ocorre principalmente pela reação de transesterificação com o uso de metanol (Knothe & Razon, 2017). A Resolução da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) nº. 45, de 2014, apresenta as indicações de qualidade exigidas para que o biodiesel seja comercializado.

Por ser comumente composto por ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES), o biodiesel possui maior degradabilidade do que o diesel. Essa característica é considerada uma vantagem ao se adicionar biodiesel ao diesel no caso de um acidente ambiental. Porém, pode ser uma desvantagem no armazenamento pois torna a mistura diesel/biodiesel mais suscetível à contaminação microbiana (Bento et al., 2016). O biodiesel também pode apresentar em sua composição pequenas quantidades de outros elementos, como glicerol e alguns íons metálicos, os quais têm as concentrações limites aceitáveis delimitadas pela resolução ANP nº. 45 (ANP, 2014). Além disso, esteróis glicosídeos, provenientes da matéria prima de origem também podem ser encontrados no biodiesel após a produção deste (Bezerra et al., 2015).

Durante o armazenamento do biodiesel podem ocorrer reações químicas e biológicas (oxidações, hidrólise e polimerizações) que resultam na formação de sólidos insolúveis, os quais precipitam e constituem um lodo de aspecto viscoso no fundo dos tanques, podendo este acarretar danos ao sistema de filtragem e armazenamento (Bondioli et al., 2008; Pinho et al., 2016).

Uma diferença marcante entre o biodiesel e o diesel é a presença de átomos de oxigênio no primeiro, a qual o torna mais polar e capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água. Esse caráter higroscópico aumenta a capacidade do

biodiesel de absorver grandes quantidades de água e possui seu limite fixado pela Resolução nº. 45 da ANP em até 200 mg kg⁻¹ (ANP, 2014; Pinho et al., 2016). Com a adição de biodiesel ao diesel a formação de precipitados pode aumentar devido à diminuição da polaridade do meio (Pinho et al., 2016). A presença dessa borra nos tanques de estocagem pode ser considerada um evento esperado em tanques de estocagem de biodiesel e diesel puros e de misturas diesel/biodiesel quando a manutenção daqueles não é realizada com frequência.

Com o tempo, o aparecimento de uma fase de água livre nos tanques de armazenamento torna o ambiente propício para o crescimento microbiano, além de facilitar as reações de degradação abiótica do combustível, como oxidações e hidrólises. A presença de uma biomassa na interface combustível-água é a constatação visual da instalação da contaminação microbiana dos tanques (Meneghetti et al., 2013; Bento et al., 2016; Zimmer et al., 2017). Os microrganismos deteriorogênicos presentes nos sedimentos encontrados no fundo de tanques de estocagem de biodiesel em usinas produtoras estarão em contato com o biodiesel produzido e serão carregados com ele durante o transporte. Ao ocorrer a mistura com diesel, e dependendo das rotinas adotadas na manutenção dos tanques de estocagem, pode ocorrer desenvolvimento microbiano. As principais consequências são a saturação prematura de filtros e desgastes nos sistemas de injeção devido ao material biológico produzido. De acordo com a legislação brasileira, a Norma ABNT NBR 15512-14 aponta algumas medidas simples, conhecidas como Boas Práticas, para a prevenção do crescimento microbiano em tanques, como a drenagem diária dos tanques, que impede o acúmulo da água livre nos tanques (Beker et al., 2016; Bento et al., 2016; Zimmer et al., 2017).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a natureza do sedimento encontrado no fundo de tanques de estocagem de biodiesel de soja comercial (aditivado) quanto à composição química e microbiana, bem como avaliar o potencial deteriorogênico da população nativa (inóculo não caracterizado, norma ASTM E1259-16 modificada) em um experimento de crescimento em até 60 dias.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Amostragem do Fundo do Tanque de Estocagem

As coletas foram realizadas em uma usina produtora de biodiesel de soja no município de Ijuí, no norte do Estado do Rio Grande do Sul. Com a permissão da diretoria da usina, um tanque de estocagem com capacidade para 2000 m³ foi aberto e seu lastro drenado. O material que permaneceu no lastro, com aspecto viscoso, apresentado na Figura 1, foi coletado assepticamente. A borra foi armazenada em temperatura ambiente e avaliada de acordo com suas características químicas e microbiológicas, conforme as análises descritas a seguir.

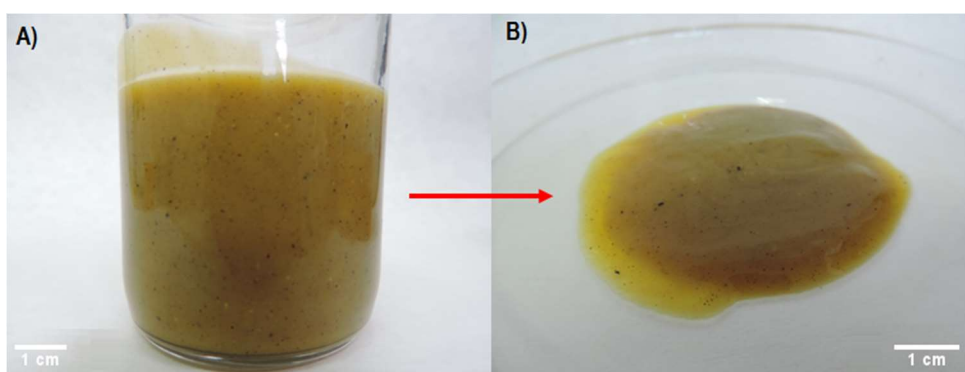


Figura 1 - Aspecto do material coletado de um tanque de armazenamento de biodiesel comercial da Usina de Biodiesel.

4.3.2 Caracterização Química

4.3.2.1 Análise por infravermelho

Para a decomposição da fase sólida, 500 mg foram pesados e transferidos para frascos de quartzo do forno de micro-ondas, volume máximo dos frascos 80 mL. Em seguida, foram adicionados a cada frasco 3 mL de HNO₃, 1 mL de H₂O (Milli-Q) e 2 mL de H₂O₂. Os frascos foram fechados e colocados no forno de micro-ondas Multiwave PRO Anton Paar. Utilizou-se o seguinte programa de aquecimento: 20 min de rampa (até 900 W); 20 min de permanência (à 900 W); e 20 min de resfriamento (0 W). A temperatura e pressão máxima atingidas foram 220 °C e 80 bar.

A amostra da borra foi então solubilizada em clorofórmio e após a solução

foi filtrada. A parte sólida foi deixada em repouso para que secasse antes da realização do teste infravermelho (FT-IR/ATR) em um espectrofotômetro Agilent Cary, acoplado num acessório de reflectância total (ATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). O espectro foi obtido em triplicata na faixa de 4000-750 cm^{-1} , em temperatura ambiente, com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

4.3.2.2 Análise da presença de esteroides por HPLC-MS/MS

Os métodos de análise aqui aplicados para as diferentes classes de esteroides foram desenvolvidos por Bezerra (2017), sendo utilizado um triplo quadrupolo de massas sequencial MS/MS (SCIEX - USA) acoplado ao sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A fonte de ionização empregada foi a de ionização química à pressão atmosférica (APCI), utilizando o experimento de monitoramento de reações múltiplas (MRM) para a quantificação. As separações cromatográficas foram realizadas em coluna C-18 Poroshell 120 (50 mm x 4,6 mm x 2,7 μm). Todo o sistema HPLC-MS/MS foi controlado pelo software Analyst 1.5.2. A Tabela 1 apresenta as particularidades de cada método de ensaio para cada classe de esteroides. A amostra foi preparada pela solubilização de 1 mL em 10 mL de diclorometano.

Tabela 1 - Condições experimentais dos métodos de análise de esteroides.

Classes de esteroides	Faixa de varredura espectral (m/z)	Temperatura da fonte de ionização APCI-MS/MS	Composição de fase móvel no HPLC	Vazão da fase móvel ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Volume de injeção da amostra (μL)
Esteroides livres (S)	300-450	400 °C	Gradiente de acetonitrila + diclorometano: 90% + 10% (v/v) 0 a 6 min 85% + 15% (v/v) 6 a 7 min 75% + 25% (v/v) 7 a 11 min.	1000	5
Esteroides esterificados (ES)	600-800	430 °C	Metanol + clorofórmio: (6:4) com adição de 200 mM de acetato de amônio por 10 min.	1000	10
Esteroides glucosídeos (SG)	500-650	350 °C	Gradiente de metanol + água (com 1% de acetonitrila): 85% + 15% (v/v) 0 a 15 min 100% de metanol 15 a 18 min 75% + 25% (v/v) 18 a 20 min.	800	10
Esteroides glucosídeos acilados (ASG)	750-950	350 °C	Gradiente de metanol + água (com 1% de acetonitrila): 85% + 15% (v/v) 0 a 5 min 100% de metanol 5 a 30 min.	1200	10

Os esteroides monitorados foram: β -sitosterol, avenasterol, brassicasterol, campesterol, colesterol, desmosterol, estigmastanol, estigmasterol, lanosterol e latosterol. Para monitoramento dos esteroides livres, consideraram-se os fragmentos gerados a partir do íon $[M - OH]^+$. Para esteroides esterificados, considerou-se a junção de cada esteroide livre a um ácido graxo diferente para formar os ésteres de esteroides. Os ácidos graxos verificados foram: mirístico (C14:0); palmítico (C16:0); palmitoleico (C16:1); esteárico (C18:0); oleico (C18:1); linoleico (C18:2); linolênico (C18:3); araquídico (C20:0); e behênico (C22:0).

Para monitoramento dos esteroides livres consideraram-se os fragmentos gerados a partir do íon $[M + NH_4]^+$. Para monitorar os esteroides glucosídeos, considerou-se a ligação entre cada esteróide livre a uma molécula de glucose (C₆H₁₂O₆). Assim, foram considerados os fragmentos gerados a partir do íon $[M + H_2O]^+$. Por último, o monitoramento dos esteroides glucosídeos se deu considerando a formação de ésteres de esteroides glucosídeos com cada ácido graxo supracitado, sendo o monitoramento das reações de fragmentação realizado pelo íon $[M + H_2O]^+$.

4.3.2.3 Análise inorgânica

As concentrações de sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram avaliadas por espectroscopia de absorção atômica de chama (FAAS) no equipamento Analyst 200, PerkinElmer. Os padrões utilizados (Na, K, Ca e Mg) foram da marca Fluka, na concentração de 1000 mg L⁻¹. Para a determinação de Na e K foi utilizada uma solução de shinkell (Cs 10 g L⁻¹ + La 100 g L⁻¹). Na Tabela 2 estão as condições de análise de cada elemento.

Tabela 2 - Condições de análise de espectroscopia de absorção atômica de chama (FAAS) para cada analito.

Analito	Fluxo de ar comprimido oxidante (L min ⁻¹)	Fluxo de combustível C ₂ H ₂ (L min ⁻¹)	Slit (mm)	Comprimento de onda (nm)
K	10	2,5	2,7/0,45	766,49
Na	10	2,5	1,8	589
Mg	8,5	4,0	2,7/1,05	285,21
Ca	10	2,7	2,7/0,6	422,67

4.3.3 Avaliação da Comunidade Microbiana Presente no Sedimento

A primeira abordagem de avaliação da comunidade microbiana presente no sedimento envolveu técnicas de sequenciamento de alto rendimento Ion Torrent. Foram realizadas tentativas de extração de DNA genômico, presente no sedimento, por meio de quatro métodos de extrações diferentes: PowerSoil Kit (MOBIO), Método de Fenol-Clorofórmio (Sambrook & Russell, 2001) e os métodos descritos por Dellaporta (1983) e Ferreira e Grattapaglia (1996). Os rendimentos foram avaliados por duas técnicas: espectrofotometria (Nanodrop Lite) e fluorometria (Quantus Promega). No entanto, as quantidade e qualidade do DNA obtido foram muito inferiores às necessárias para a realização da avaliação da composição da comunidade microbiana por Ion Torrent, exigenciados protocolos fornecidos pelo fabricante. Nesse sentido, partiu-se a uma segunda abordagem na tentativa de conhecer os microrganismos predominantes na amostra e isolá-los por métodos tradicionais microbiológicos.

Sendo assim, um volume de 2,5 g de amostra de borra foi adicionado a erlenmeyers contendo 40 mL de biodiesel de soja estéril (como fase oleosa) e 80 mL de meio mínimo mineral Bushnell e Haas (1941) ou 80 mL de água ultrapura (como fases aquosas com diferentes aportes de nutrientes). Esses erlenmeyers foram armazenados durante 20 dias em cultivo estático e agitador orbital a 30 °C, em triplicata. Nos tempos experimentais de 0, 2, 24, 48, 120, 168, 360 e 480 h foram realizadas diluições seriadas decimais e posterior plaqueamento em PCA (meio de cultura para contagem de bactérias), ágar malte (meio de cultura para fungos), TSA (meio de cultura para bactérias) e R2A (meio de cultura para bactérias de crescimento lento) para estimular o crescimento microbiano e assim possibilitar o isolamento do maior número de microrganismos cultiváveis possível.

4.3.3.1 Identificação dos isolados cultiváveis

Posteriormente à prospecção de microrganismos procedeu-se à identificação molecular dos isolados por meio de sequenciamento. Realizou-se a extração de DNA dos fungos pelo método de Ferreira e Grattapaglia (1996) e das bactérias com o Kit PureLink® Genomic DNA e, subsequentemente, procedeu-se à amplificação por PCR da região ITS (Internal Transcribed Spacer), que separa os genes 18S e 28S do rDNA (para os fungos) e o gene 16S (para as bactérias).

A identificação das bactérias foi iniciada por coloração de Gram, morfologia celular e colonial e, posteriormente, por meio de um PCR com a amplificação do gene 16S com o auxílio dos primers F-C27 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e R-530 (CCGCGGCTGCTGGCACGTA), gerando um produto de 530 pb.

A identificação dos fungos filamentosos foi realizada inicialmente pela técnica de microcultivo e posteriormente por meio de PCR com amplificação da região ITS-5.8S-ITS2 com o uso dos primers ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTCGCG) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), gerando um produto de 550 pb. Os produtos de PCR foram purificados com auxílio do Kit PureLink™ PCR Purification da Invitrogen. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Reaction kit (Applied BioSystems, Foster City, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as análises dos fragmentos foram processadas pelo sequenciador automático ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied BioSystems, Foster City, CA). As sequências geradas foram comparadas com o banco de dados GenBank (ferramenta on-line disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Após o isolamento e a identificação, foi realizada uma caracterização dos microrganismos isolados quanto à capacidade de produção da enzima lipase, envolvida na biodegradação de biodiesel, pela inoculação nos meios agar Tributirina e Rodamina B (Hasan et al., 2009).

4.3.4 Capacidade Deteriogênica da Borra de B100

Os microcosmos foram montados em frascos de vidro contendo 60 mL de meio mínimo mineral estéril e 30 mL de fase oleosa (biodiesel puro de soja comercial

[B100]). Foram avaliados três tratamentos de acordo com o nível de contaminação microbiana. O tratamento controle (CTE - biodiesel comercial esterilizado) constituiu-se de uma fase oleosa esterilizada utilizando um sistema de filtração a vácuo, em frasco Kitassato e filtro, com membranas de porosidade de 0,22 μm (marca Milipore). O tratamento como recebido (CR - biodiesel comercial como recebido) constituiu-se de fase oleosa utilizada como recebida da distribuidora, com a contaminação proveniente de seu manejo na cadeia de distribuição de biodiesel. O único tratamento que recebeu inóculo foi o BI (biodiesel estéril comercial inoculado), ao qual foi adicionado 500 mg da borra proveniente do lastro do tanque de estocagem, tendo como base a Norma ASTM E1259-16. O experimento foi realizado em triplicata e incubado em estufa a 30 °C por 60 dias. Todos os tratamentos passaram por agitações periódicas (a cada 5 dias, a 90 rpm, 30 °C, por 30 min) com o intuito de simular o abastecimento e retirada de combustível que ocorrem nos tanques da indústria.

Durante as agitações foi observado que, em comparação aos momentos iniciais, no tratamento BI (biodiesel comercial inoculado) alguns componentes da borra diluíram-se no biodiesel e/ou fase aquosa, o que fez com que o peso inicial adicionado (500 mg) fosse desconsiderado. A fim de quantificar o peso inicial da borra para distingui-la do crescimento microbiano, foi realizada uma determinação pós-diluição do inóculo ao tempo inicial de toda a composição dos frascos, em triplicata. As mesmas condições experimentais foram mantidas.

Nos tempos amostrais de 0, 2, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias foi avaliado o crescimento microbiano por quantificação da biomassa total formada na interface óleo-água de cada frasco, por método gravimétrico (peso seco). Aos 60 dias de avaliação a fase aquosa do tratamento como recebido foi inoculada em placas de petri contendo meio de cultura para o isolamento de fungos e bactérias (malte e PCA [*plate count agar*]), visando a identificação da biomassa produzida pela microbiota residente do biodiesel comercial.

O morfotipo predominante foi identificado por meio das análises descritas no item 4.3.3.1. Nos tempos iniciais e finais do experimento, medidas de pH da fase aquosa foram avaliadas. Nos tempos 2 e 60 dias as fases aquosas de todos os tratamentos foram avaliadas por GC/FID, visando observar os compostos do biodiesel que poderiam ter migrado para a fase aquosa e seu respectivo consumo pelos microrganismos presentes nos tratamentos contaminados. Procedeu-se à extração da

fase aquosa por meio de 3 lavagens sequenciais de 10 mL da fase aquosa com 20 mL de diclorometano (Merck) e posterior concentração da amostra até 500 μL . Passou-se a amostra para um vial de 1,5 mL, no qual foram adicionados 130 μL de padrão interno nonadecanoato de metila (Sigma) e, subsequentemente, completou-se o volume com diclorometano para 1 mL de amostra mais padrão interno. As amostras foram injetadas em um equipamento Shimadzu GC-17A, equipado com uma coluna Agilent EN14103 e procedeu-se à identificação dos ésteres presentes na fase aquosa com as seguintes condições de análise: injetor e detector a 250 °C, coluna 100 °C, seguida de aquecimento a 4 °C min^{-1} até 240 °C, temperatura na qual permaneceu por 25 min em isoterma.

Os tempos iniciais e finais da fase oleosa foram avaliados por espectroscopia no infravermelho a fim de identificar possíveis mudanças nas cadeias carbônicas do biodiesel causadas pelo crescimento microbiano. Foram avaliadas as amostras correspondentes ao tempo inicial (B100 T0: biodiesel sem a adição de fase aquosa e/ou inóculo); ao tempo inicial logo após a adição da borra como inóculo (BI T0) e aos tempos finais de todos os tratamentos (CTE T60: controle, CR T60: como recebido e BI T60: borra como inóculo).

4.3.5 Análises Estatísticas

Os dados obtidos neste trabalho foram estatisticamente analisados com auxílio do programa BioEstat versão 5.0 (Analystsoft). Análises de variância e teste de Tukey ao nível de 5% de significância foram realizadas. A avaliação dos dados gerados pela técnica de espectroscopia de infravermelho foi realizada com o auxílio do software Chemostat.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Análise química do sedimento de B100

4.4.1.1 Análise por infravermelho

O material coletado do fundo dos tanques e avaliado neste trabalho

apresentou um aspecto viscoso e, segundo a análise de infravermelho da fase sólida, o espectro gerado é predominantemente composto por ésteres de ácidos graxos, entre outros compostos. Na Figura 2, a banda que aparece aproximadamente na região de 1.740 cm^{-1} é referente às vibrações do grupo carbonila de ésteres ($\text{C}=\text{O}$) e na região 1.080 a 1.030 cm^{-1} encontram-se as bandas de absorção referentes às vibrações da ligação $\text{C}-\text{O}$ que estão presentes nos ésteres alifáticos constituintes do biodiesel. As bandas que aparecem na região de 2970 a 2840 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações das ligações $\text{C}-\text{H}$ dos grupamentos metila (CH_3) e metileno (CH_2). A absorção em 3400 cm^{-1} pode ser atribuída às vibrações de grupos $-\text{OH}$.

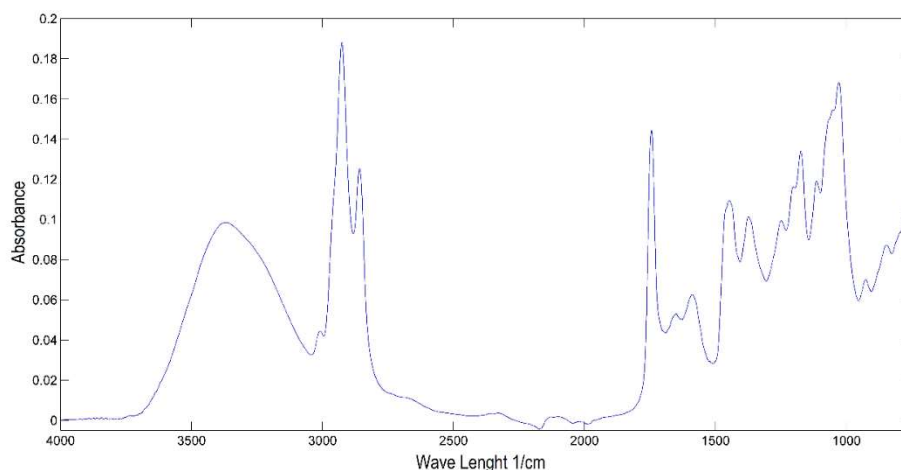


Figura 2 - Espectro de Infravermelho médio da amostra de Borra do tanque de estocagem de biodiesel.

Durante o processo de produção do biodiesel podemos encontrar, na fase óleo, ácidos graxos não esterificados ou ainda em processo de esterificação. Os mono, di e triglicerídeos e outros compostos considerados impurezas do biodiesel, se não forem removidos completamente durante o procedimento de limpeza da reação de transesterificação, podem reagir e precipitar, formando a borra que encontramos no lastro da estocagem da usina (Dunn, 2012; Pinho et al., 2016). Além disso, a presença de esteróis glicosídeos, compostos com baixa solubilidade em biodiesel, tem sido apontada, na literatura, como a principal causa da formação desses sedimentos (Bondioli et al, 2008; Plata et al., 2015). Sendo assim, durante a estocagem onde o biodiesel permanece estático, aqueles podem decantar junto a outros elementos já detectados na literatura (Bondioli et al., 2008; Bezerra et al., 2015).

Plata et al. (2015) avaliaram materiais insolúveis encontrados em biodiesel

de óleo de palma (dendê) e os identificaram como sendo monopalmitina (monoglicerídeo saturado) e esteróis glicosídeos. Bondioli (2009) identificou monoglicerídeos saturados e ácidos graxos em sedimentos provenientes de biodiesel de soja. Borras encontradas em biodiesel de outras matérias primas, como o sebo bovino, também foram identificadas como sendo constituídas preponderantemente pelos monoglicerídeos saturados monopalmitina e monoestearina (Fernandes et al., 2012).

Outro aspecto importante na formação de sedimentos no biodiesel é a estabilidade oxidativa. Durante o período de armazenamento essa propriedade também pode agravar o surgimento de sedimentos. Um biodiesel com baixa estabilidade à oxidação pode aumentar a concentração de ácidos graxos livres no combustível, aumentando a viscosidade e causando a formação de gomas e depósitos (Brito, 2013).

Pinho et al. (2014) identificou em biodiesel, após processo de envelhecimento acelerado, bandas que aparecem na região de 1680-1820 cm^{-1} como sendo características de ácidos carboxílicos, cetonas e aldeídos, resultado da oxidação dos constituintes do biodiesel. Os espectros gerados por esses produtos de oxidação podem elevar a absorção na região de 1740 cm^{-1} , o que poderia aumentar falsamente a quantidade de ésteres detectados. Porém, excetuando-se a banda dos ésteres (C=O) nos dados apresentados em nosso trabalho, não foram observadas outras bandas nesta faixa espectral.

4.4.1.2 Análise da presença de esteróis glicosídeos na borra

As principais classes de esteroides foram analisadas no material insolúvel com o objetivo de evidenciar a presença desses compostos. A Figura 3 apresenta os cromatogramas obtidos pela análise de esteroides por HPLC-MS/MS no material em estudo, o que não o caracteriza como composto de esteroides. Os resultados mostram que não foi possível detectar ou mesmo quantificar qualquer esteroide na matriz de estudo. A intensidade de sinal foi muito baixa frente aos limites de detecção dos métodos utilizados (Bezerra, 2017).

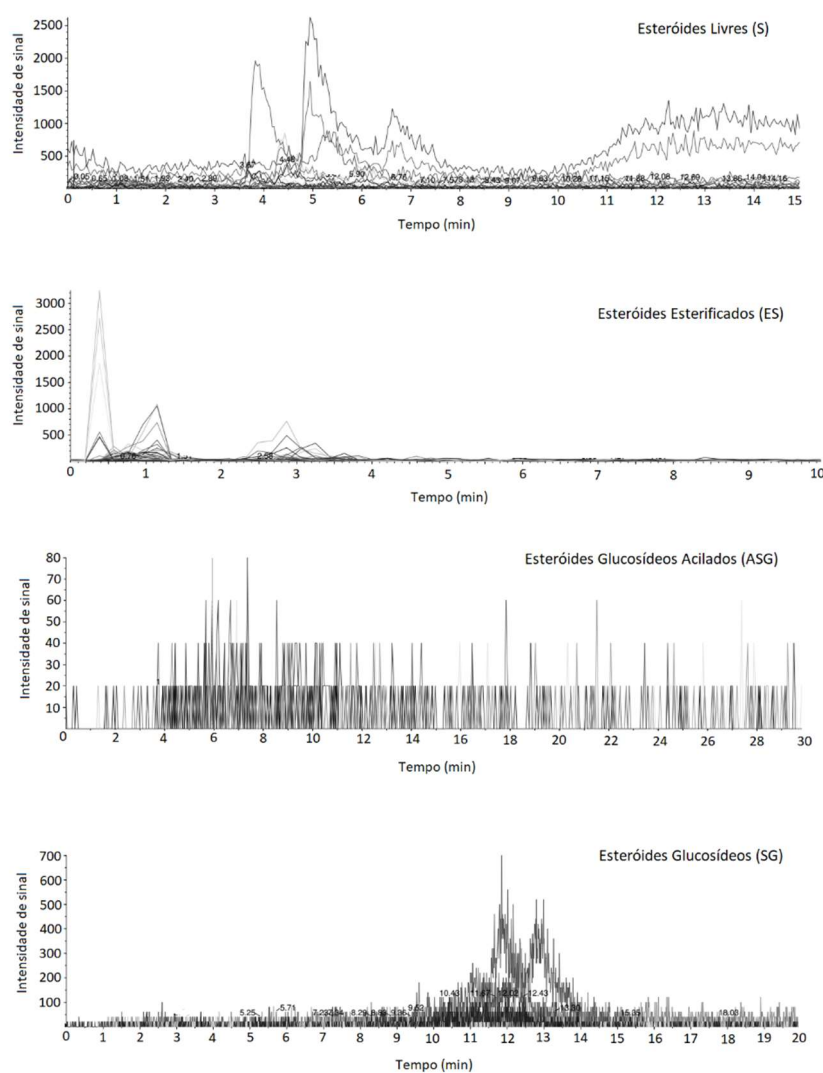


Figura 3 - Cromatogramas referentes à análise das principais classes de esteroides por HPLC-MS/MS.

Os resultados de alguns autores (Bondioli et al., 2008; Erinç & Özcan, 2009) sugerem que esteroides glucosídeos são a classe de esteroides mais propensa à precipitação no biodiesel, isso devido principalmente à sua alta polaridade frente aos ésteres de ácidos graxos. Outras publicações da área de esteroides afirmam, no entanto, que esses compostos podem levar à interconversão entre suas classes (livres, esterificados, glucosídeos, acilglucosídeos) (Piironen et al., 2000).

4.4.1.3 Análise inorgânica da borra de B100

A análise por FAAS evidenciou uma alta concentração de Na: $10,8 \pm 0,5$ mg g⁻¹; e baixas concentrações de K em $26,1 \pm 0,3$ µg g⁻¹, de Ca em $18,3 \pm 0,5$ µg g⁻¹ e de Mg em $26,1 \pm 0,3$ µg g⁻¹.

O sódio, maior constituinte inorgânico presente nas amostras de borra, pode ter sua origem nos catalisadores da transesterificação (NaOH) (Verma & Sharma, 2016) e pode, após a produção do biodiesel, caso o processo de limpeza seja deficiente, decantar junto com os demais elementos do biodiesel anteriormente identificados por análises químicas no lastro dos tanques de estocagem da usina.

O dano a motores por corrosão e a própria deterioração do biocombustível podem ser induzidos pela presença de Na, K, Ca e Mg no biodiesel. Além disso, a presença de Ca e Mg aumenta a formação de sedimentos e sabões na câmara de combustão, levando a danos em algumas partes de motores. Reações de neutralização e lavagem com água são ações efetivas recomendadas para remoção desses compostos (Banga & Varshney, 2010).

4.4.2 Isolamento de Microrganismos Cultiváveis

Foram prospectados sete bactérias e cinco fungos filamentosos. Todos os fungos filamentosos foram isolados do tratamento em agitação e provenientes do tratamento com meio mínimo mineral como fase aquosa. Cinco bactérias diferentes foram isoladas do tratamento em agitação, ao passo que o cultivo estático favoreceu apenas o aparecimento de dois isolados bacterianos. A utilização de água ultrapura não favoreceu o isolamento de microrganismos, visto que os mesmos isolados foram recuperados também no cultivo com meio mínimo mineral Bushnell e Haas (1941). Os resultados obtidos para cada isolado estão descritos na Tabela 3. Os gêneros e espécies obtidos já foram propostos na literatura.

Tabela 3 - Identificação por Sequenciamento Sanger e detecção de enzimas pelos isolados obtidos da borra.

Strain LAB-BIO	Identificação	Accession Number (GenBank)	Meio Rodamina B ^a	Meio Tributirina ^a
LABBIO2	<i>Xylariales sp.</i>	MG595218	-	-
LABBIO3	<i>Penicillium citrinum</i>	MG595219	+	+
LABBIO4	<i>Penicillium simplicissimum</i>	MG595220	-	+
LABBIO5	<i>Penicillium corylophilum</i>	MG595221	+	+
LABBIO6	<i>Hypocreales sp.</i>	MG595222	+	+
LABBIO7	<i>Micrococcus luteus</i>	MG595223	-	+
LABBIO8	<i>Microbacterium sp.</i>	MG595224	-	-
LABBIO9	<i>Cellulomonas sp.</i>	MG595225	-	-
LABBIO10	<i>Curtobacterium sp.</i>	MG595226	-	+
LABBIO11	<i>Bacillus megaterium</i>	MG595227	-	+
LABBIO12	<i>Bacillus sp.</i>	MG595228	+	+
LABBIO13	<i>Bacillus pumilus</i>	MG595229	+	+

O gênero *Micrococcus* é descrito como um gênero de microrganismos deteriorogênicos de combustível (Soriano et al., 2015). Gêneros como *Curtobacterium*, *Bacillus* e *Microbacterium* também já foram relacionados à degradação de hidrocarbonetos e o gênero *Cellulomonas* à degradação de celulose (Pavic et al., 2013; Kane, 2015; Ferreira et al., 2016; Yadav et al., 2016; Qin et al., 2017). O gênero *Penicillium* é encontrado nos mais diversos ambientes e é amplamente discutido na literatura como deteriorogênico de diesel e biodiesel (Allsopp et al., 2016).

4.4.2.1 Detecção da capacidade de produção de enzimas hidrolíticas

Os meios de cultura utilizados para a detecção da enzima lipase foram os meios Rodamina B e Tributirina, os quais são amplamente utilizados para a prospecção de microrganismos com capacidade de produção dessa enzima cuja importância industrial é bem estabelecida (Hasan et al., 2009). Após o isolamento, os microrganismos obtidos foram inoculados nesses meios e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. As lipases são enzimas do grupo das hidrolases que, juntamente com as esterases, estão envolvidas na hidrólise de ésteres, glicerinas e ácidos graxos de cadeia longa (Lopes et al., 2011).

Os mecanismos envolvidos no processo de biodegradação do biodiesel permanecem pouco elucidados. Uma provável rota para a biodegradação de ésteres de ácidos graxos envolve a participação de enzimas como as esterases (carboxylic-esterhydrolases; EC 3.1.1.1) e lipases (triacylglycerolacylhydrolases; EC 3.1.1.3) (Casas-Godoy et al., 2012). Inicialmente, ocorre uma hidrólise do metil ou etil éster por uma esterase (ou lipase), a qual produz um ácido graxo e um álcool (David Lee Nelson, 2008; Hausmann & Jaeger, 2010). Na segunda etapa, os ácidos graxos são oxidados via β -oxidação, incorporando produtos finais desta ao ciclo de Krebs que, por sua vez, podem ser utilizados no metabolismo para a síntese de biomassa celular, por exemplo (David Lee Nelson, 2008; Hausmann & Jaeger, 2010; Khoury et al., 2011).

Os microrganismos obtidos a partir da borra encontrada no fundo dos tanques de estocagem apresentaram capacidade para produzir enzimas relativas à degradação de biodiesel, o que nos sugere que o sedimento pode ter capacidade deteriogênica ainda não investigada.

4.4.3 Capacidade Deteriogênica de Microrganismos Nativos da Borra

Com o intuito de avaliar se a população microbiana, cultivável e não cultivável, presente no sedimento coletado possuiria a capacidade de, em condições ótimas, crescer e se desenvolver às expensas do biodiesel de soja, causando danos ao biocombustível, foi realizada uma estocagem simulada utilizando microcosmos durante 60 dias.

4.4.3.1 Crescimento Microbiano

4.4.3.1.1 Peso seco

O valor de peso registrado dos frascos do tratamento com a borra como inóculo (BI) não alcançou em nenhum dos tempos avaliados a quantidade adicionada inicialmente (500 mg), o que sugere a diluição de seus componentes nas fases constituintes do microcosmos. Não foi observado crescimento visual na interface óleo-

água do tratamento BI. O tratamento CR (biodiesel como recebido) apresentou crescimento microbiano estatisticamente diferente dos valores obtidos dos controles após 40 dias de análise, indicando que a população microbiana nativa provavelmente estava em baixa densidade. No entanto, após 60 dias, a biomassa recuperada da interface dos frascos foi de $52,9 \pm 9,9$ mg.

Na Figura 4A é possível visualizar a biomassa com aspecto escuro proveniente do desenvolvimento de microrganismos nativos do biodiesel comercial. Após 60 dias, a prospecção do material em meio de cultivo (PCA) indicou a presença da levedura *Aureobasidium pullulans*, identificada molecularmente pela mesma técnica descrita no item 4.3.3.1 como pertencente ao grupo das leveduras negras, ou *black yeasts* (Figura 4B e 4C) (Deshpande et al., 1992). Na Figura 4D, no entanto, não foi constatada a presença de biomassa retida no filtro apenas de material particulado de natureza não biológica, produto de degradação abiótica. Estes resultados devem-se provavelmente à baixa densidade de microrganismos na borra utilizada como inóculo e pelo uso do biodiesel comercial estéril.

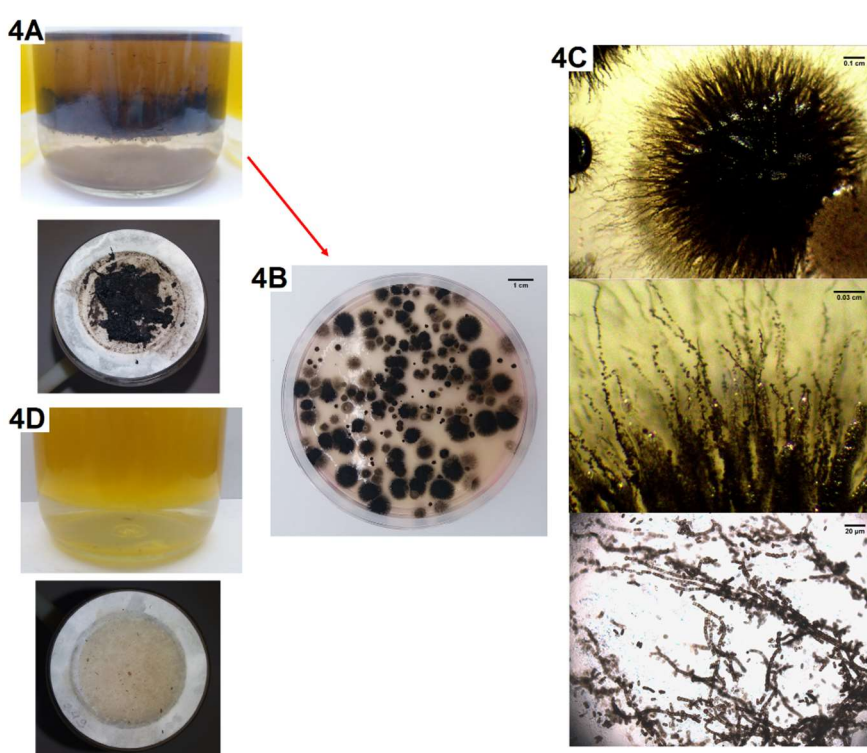


Figura 4 - Aspecto dos frascos experimentais com a fase oleosa (biodiesel) e a fase aquosa ao final de 60 dias do experimento. 4A: Tratamento com biodiesel comercial como recebido (CR); 4B: Detalhe do tratamento CR, aspecto das colônias da levedura em meio de cultura; 4C: Fotomicrografias da levedura *Aureobasidium pullulans*; e 4D: Tratamento com biodiesel estéril inoculado com a borra (BI) e aparência da biomassa retida na membrana filtrante.

A formação de borras oriundas da degradação biótica e abiótica tem sido investigada durante o armazenamento de diesel e de suas misturas com biodiesel. Desde a introdução do biodiesel, a comunidade usuária percebeu uma maior tendência à formação de borras durante a estocagem de combustíveis (Bücker et al., 2011; Yakoob et al., 2014). A borra presente em tanques de armazenamento de B100, oriundas de usinas de biodiesel, passa despercebida, já que essa pode ser reutilizada no processo de obtenção do biodiesel pela própria usina.

A natureza química desse resíduo já foi bem explorada na literatura (Bondioli, 2009; Fernandes et al., 2012; Plata et al., 2015). No entanto, nenhum esforço foi realizado para verificar se essa borra, a qual entra continuamente em contato com o biodiesel produzido pela empresa e somente é drenada poucas vezes ao ano, poderia ser uma fonte de contaminação com microrganismos deteriorogênicos de biodiesel, os quais, ao encontrarem uma condição favorável, poderiam crescer e degradar o combustível estocado.

Neste trabalho foi observado que a borra apresenta baixa densidade microbiana capaz de crescer nas condições estabelecidas pelo experimento. Os resultados de biomassa formada indicaram que o biodiesel que passou por toda a cadeia de distribuição e foi cedido para o experimento (tratamento como recebido – CR) apresentou uma comunidade microbiana mais adaptada a crescer e formar biomassa às expensas do biodiesel.

4.4.3.2 Medidas de pH

Os resultados de medidas de pH da fase aquosa sugerem uma tendência à acidificação do meio mínimo mineral a partir de 40 dias de incubação dos microcosmos contaminados com microrganismos quando comparados aos frascos controle estéreis ($p < 0,05$). Entre esses, os valores permaneceram similares até o final do experimento, atingindo $6,63 \pm 0,11$ (CR) e $6,65 \pm 0,10$ (BI) e não diferindo entre si estatisticamente ($p > 0,05$). Na primeira etapa de degradação, ambos ésteres saturados e insaturados são transformados por microrganismos via β oxidação, produzindo ácidos orgânicos (Aluyor et al., 2009). Produtos de oxidação, metabólitos produzidos durante a degradação de hidrocarbonetos podem diminuir o pH da fase

aquosa durante o armazenamento e acelerar processos de corrosão dos tanques de estocagem (Bücker et al., 2011). Os resultados obtidos na caracterização química da borra indicam que provavelmente a queda detectada no pH da fase aquosa no tratamento BI pode ser devida aos produtos de oxidação presentes no sedimento coletado e utilizado como inóculo nesse tratamento.

O crescimento microbiano em combustíveis produz vários metabólitos como ácidos carboxílicos, álcoois e cetonas, porém o tamponamento dos meios de cultura utilizados como fase aquosa dos experimentos pode mascarar a detecção desses (Bento et al., 2005; Cazarolli et al., 2016). Bento et al. (2005) observaram a queda do pH de 7,0 para 4,8 do meio mínimo mineral Bushnell e Haas (1941) durante o crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, em óleo diesel como fonte de carbono. A fase aquosa foi avaliada com SPME (microextração em fase sólida) e foram identificados compostos, como álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos, como, por exemplo, o ácido propiônico.

Liang et al. (2017) caracterizaram a comunidade microbiana de águas residuais oleosas e seu papel na degradação de diesel marinho (F76 e FT-F76) e na corrosão do aço carbono sob condições anaeróbias. As presenças de compostos como alcanos ramificados que variaram de C13 a C19 foram identificadas na água residual oleosa. Além disso, foram também detectadas uma série de alcanos lineares (C10-C14) e potenciais metabólitos ácidos associados à biodegradação de hidrocarbonetos (ácidos benzóico, hexanóico, hexadecanóico e octadecanóico).

4.4.3.3 Avaliação da migração de compostos do biodiesel para a fase aquosa e o seu consumo pela comunidade microbiana presente nas amostras

Na fase aquosa, foram detectados compostos identificados como ésteres de ácidos graxos e estão apresentados com suas respectivas concentrações na Tabela 4. Também foram detectados picos provenientes de compostos presentes nas amostras, mas que não foram correlacionados a nenhum éster esperado proveniente do biodiesel. Ésteres de cadeias longas (com mais de 16 carbonos) foram detectados em todos os tratamentos nas fases aquosas de 2 e 60 dias. Alguns ésteres com cadeias maiores de 20 carbonos foram detectados para algumas amostras (CTE T2;

CR T2 e T60; e BI T60).

Tabela 4 - Concentração dos ésteres de ácidos graxos detectados por GC/FID na fase aquosa do experimento aos 2 e 60 dias. Valores entre os tratamentos com a mesma letra sobrescrita são estatisticamente indistinguíveis pelo Teste de Tukey, com $P > 0.05$.

Ésteres detectados na fase aquosa ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CTE t2	CTE t60	CR t2	CR t60	BI t2	BI t60
C16	56,9±2,9 ^{AB}	43,3±9,9 ^B	40,3±9,9 ^B	52,4±9,6 ^B	154,1±12,0 ^A	41,4±6,1 ^B
C18	24,1±1,3 ^{AB}	17,5±4,4 ^B	16,4±4,1 ^B	24,0±3,7 ^B	61,6±4,0 ^A	16,2±2,4 ^B
C18:1	123,0±2,8 ^{AB}	99,6±18,6 ^B	94,2±13,3 ^B	132,5±17,3 ^B	314,1±38,9 ^A	97,7±14,1 ^B
C18:2	270,4±7,4 ^{AB}	219,0±42,5 ^B	206,4±24,6 ^B	249,3±92,0 ^B	708,9±89,4 ^A	213,7±27,6 ^B
C18:3	32,9±0,7 ^{AB}	26,5±5,5 ^B	24,5±2,5 ^B	25,5±13,0 ^B	84,5±9,9 ^A	25,3±2,7 ^B
C20:1	-	-	17,4±0,0 [*]	-	-	-
C20:4	8,7±0,0 [*]	-	-	13,4±0,0 [*]	-	-
C22:1 e/ou C20:3	-	-	18,9±0,0 [*]	-	-	8,2±1,4 [*]

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as quantidades detectadas para todos os ésteres nas condições controle e como recebido (CR). Esses resultados sugerem que a microbiota nativa não degradou os ésteres monitorados presentes na fase aquosa. Estudos anteriores constataram baixa degradação dos ésteres por microrganismos em condições similares de crescimento (Bücker et al., 2011; Cazarolli et al., 2014). Outros compostos, tais como glicerol, mono, di e triglicerídeos não esterificados e esteróis glicosídeos podem ser utilizados como carbono para o crescimento microbiano.

Para o tratamento BI foi observada uma redução significativa na concentração dos ésteres C16, C18, C18:1, C18:2 e C18:3 após 60 dias de incubação, porém esse não foi o tratamento que apresentou biomassa decorrente do crescimento microbiano, sugerindo uma degradação abiótica desses ésteres. Essa redução também pode estar associada a processos de degradação natural (oxidação e hidrólise) agravados pela presença da borra coletada dos tanques de estocagem. O excesso de íons metálicos pode catalisar reações de oxidação e polimerização de hidrocarbonetos (Banga & Varshney, 2010). A presença de íons observados na amostra de borra pelas análises de FAAS pode ter sido responsável pela redução dos ésteres detectados na fase aquosa do tratamento BI.

Ésteres como C22:1 e/ou C20:3 presentes em duas amostras (CR t2 e BI t60) não puderam ser separados pelas condições aplicadas ao cromatógrafo. Em ambas as amostras esses ésteres apareceram aos 60 dias de incubação, não sendo detectados no tempo inicial na fase aquosa. Esses resultados sugerem que os ésteres que migraram nos tempos iniciais foram prontamente transformados e/ou consumidos pela microbiota presente, ou que esses ésteres com cadeias mais longas e, por consequência, mais hidrofóbicas demoraram mais tempo para migrar do que os outros componentes.

Outros autores utilizaram metodologia semelhante para detectar ésteres provenientes da fase oleosa nas fases aquosas do experimento (Wu et al., 2015; Wu et al., 2016). Wu et al. (2015) e Wu et al. (2016) observaram a biodegradação anaeróbia de biodiesel de soja e misturas de diesel em condições metanogênicas e de redução de sulfato e concluíram que com o aumento da fração do biodiesel adicionado ao diesel a taxa de biodegradação da fase oleosa foi correlacionada com a concentração de FAMES solúveis na água.

4.4.3.4 Análise de infravermelho: biodegradação da fase oleosa

O conjunto de espectros gerados de todos os tratamentos pela técnica de infravermelho referente às amostras da fase oleosa do experimento é mostrado na Figura 5. Os resultados indicam que não houve uma degradação significativa ao longo do experimento e nas condições avaliadas.

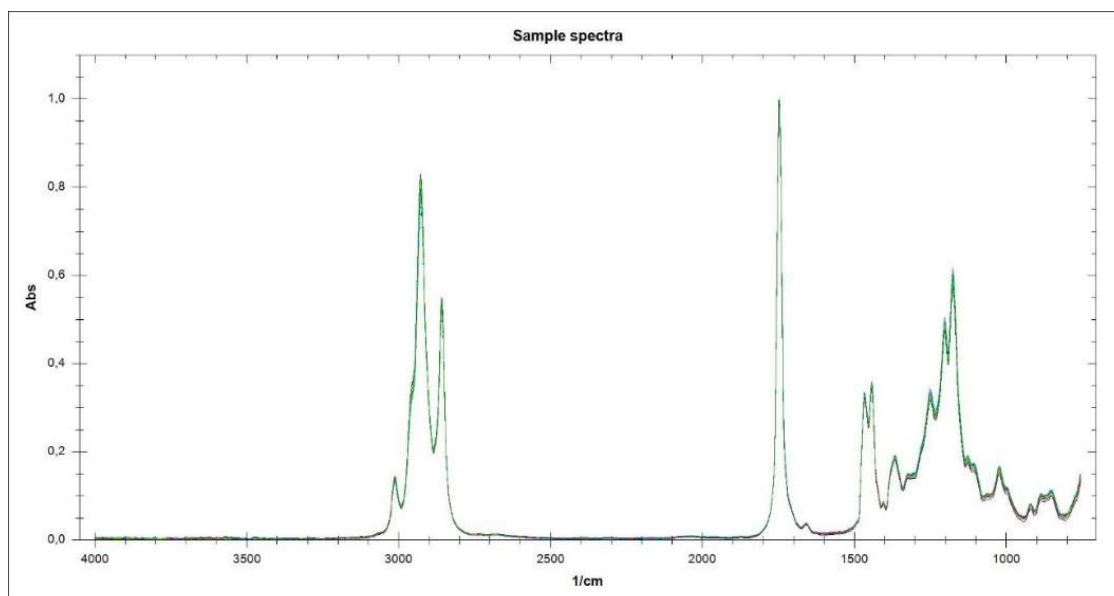


Figura 5 - Espectros gerados pela técnica de infravermelho das amostras de biodiesel coletadas antes e após 60 dias de incubação a 30 °C.

Os dados espectrais foram avaliados pela análise de componentes principais (PCA), sendo o gráfico de escores apresentado na Figura 6. Os resultados da PCA indicam que, com duas componentes principais, foi possível explicar 91,68% da variância dos dados. De acordo com o gráfico de pesos da primeira componente a principal diferença entre as amostras foi a região da banda da carbonila. Os resultados da PC1 sugerem que as amostras B100 t0 (tempo inicial), ou seja, a forma como o Biodiesel se apresentava anteriormente ao experimento, separou-se dos demais grupos avaliados com escores positivos. Esses dados sugerem que após 60 dias de armazenamento simulado a estrutura de cadeias carbônicas presentes no biodiesel se modificou, provavelmente devido à degradação abiótica, ocorrida em todas as amostras, inclusive na controle.

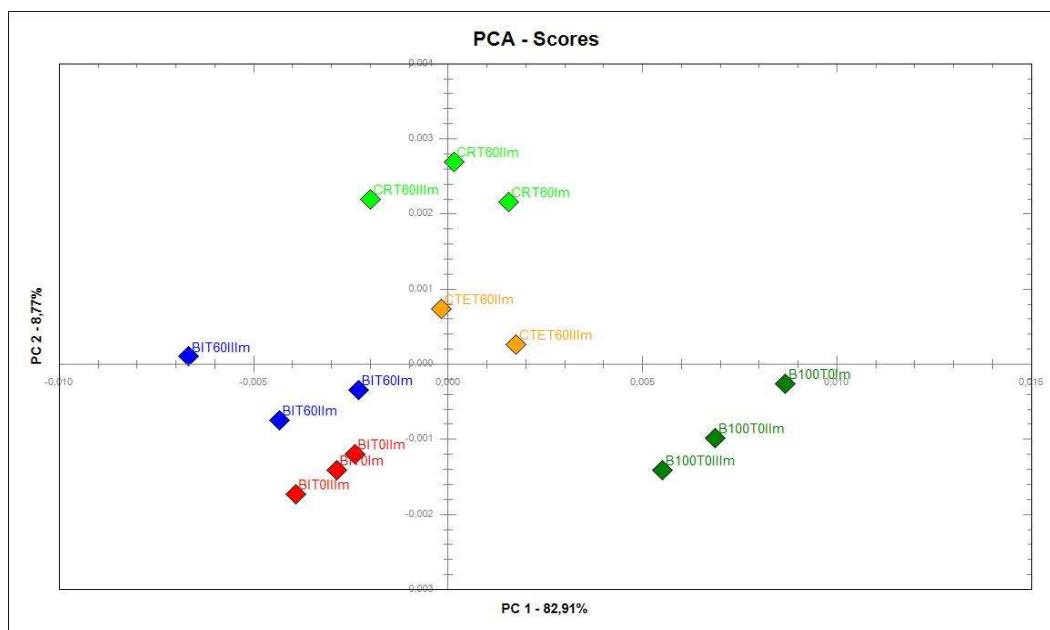


Figura 6 - Análise de PCA dos dados gerados pelos espectros de Infravermelho das amostras de biodiesel coletadas antes e após 60 dias de incubação a 30 °C. (B100 – tratamento fase oleosa inicial; CTE – tratamento controle; CR - tratamento como recebido; BI – tratamento com a borra como inóculo).

Pela perspectiva da PC2, as amostras foram separadas entre CR t0 e CR t60 (com escores positivos) e CTE t60, BI t0 e BI t60 (com escores negativos). Como consequência desses resultados podemos supor que as amostras do tratamento CR apresentaram uma tendência à biodegradação, já que nessas amostras a presença de microrganismos autóctones do sistema de transporte e estocagem de combustíveis foi detectada. A degradação, porém, de acordo com os espectros gerados pela técnica de infravermelho (Figura 4), não foi significativa. Os gráficos de pesos da PC2 mostraram que as amostras controle e as do tratamento BI preservaram suas estruturas de forma similar. Sendo assim, a diferença observada dessas para as amostras de B100 t0 pode sugerir que a própria borra, ao ser adicionada e diluída nas amostras de biodiesel do tratamento BI, tenha interferido na composição do biodiesel utilizado nesse experimento de 60 dias. Outros autores utilizaram a técnica de leitura do espectro infravermelho para detectar a biodegradação de combustíveis diesel e biodiesel (B5 e B10) (Souza et al., 2016), porém em nossas análises não foi possível relacionar as diferenças encontradas à biodegradação.

4.5 CONCLUSÕES

Os resultados de avaliação química do sedimento indicaram a presença de ésteres de ácidos graxos e íons metálicos, não sendo detectados esteroides glicosídeos. Foram isolados sete bactérias e cinco fungos filamentosos, evidenciando uma comunidade microbiana cultivável associada ao sedimento. No entanto, a população microbiana presente na borra coletada não foi capaz de produzir biomassa significativa em 60 dias na presença de biodiesel como fonte de carbono e meio mínimo mineral como fonte de nutrientes. Isto se deu, provavelmente, devido à baixa densidade microbiana inicial. Os baixos valores de degradação obtidas na análise de infravermelho sugerem que a borra coletada avaliada não representa uma fonte deteriogênica potencial durante a estocagem de biodiesel em até 60 dias.

4.6 AGRADECIMENTOS

Ao LAB-BIO/UFRGS, ao Instituto de Química da UFRGS, ao INT, ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas e à Usina de Biodiesel 3 Tentos.

4.7 CONFLITOS DE INTERESSE

A autora Marcia Veroneze Bisol é filiada à uma Usina de Biodiesel 3 Tentos, a qual não financiou ou participou das análises e conclusões do estudo, não interferindo na divulgação dos dados e materiais aqui apresentados.

4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allsopp, D., Seal, K., Gaylarde, C., Bento, F. M., Shirakawa, M., & Saad, D. S. (2016). *Introdução à biodeterioração*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2014, 25 de agosto). Resolução ANP nº 45. *Diário Oficial da União*. Recuperado em 08 de janeiro de 2019, de <http://www.anp.gov.br>.
- Banga, S., & Varshney, P. K. (2010). Effect of impurities on performance of biodiesel:

- A review. *J Sci. Ind. Res. India*, 69, 575-579.
- Beker, S. A., Machado, M. E., Maciel, G. P., Silva, R., Cataluña, R., Caramão, E. B., & Bento, F. M. (2016). Antimicrobial potential of bio-oil for use in diesel oil B10. *J. Braz. Chem. Soc.*, 27(1), 91-98.
- Bento, F. M., Beech, I. B., Gaylarde, C. C., Englert, G. E., Muller, I. L. (2005). Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 21(2), 135-142.
- Bento, F. M., Peralba, M. C. R., Ferrão, M. F., Zimmer, A. R., Azambuja, A. O., Barbosa, C. S. et al. (2016). Diagnóstico, Monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento. In Pinho, D. M. M., & Suarez, P. A. Z. (Orgs.), *Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle*. (1a. ed.). Brasília: CDT, UNB.
- Bezerra, K. D. S., & Antoniosi Filho, N. R. (2015). Análise comparativa do conteúdo em esteróides livres de diferentes óleos, gorduras e biodieseis por cromatografia gasosa. *Quim. Nova*, 38(4), 498-505.
- Bezerra, K. S. (2017). *Desenvolvimento de metodologias por HPLC-APCI-MS/MS para análise de esteróides livres e conjugados em óleos, gorduras e biodiesel*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Bondioli, P., Cortesi, N., & Mariani, C. (2008). Identification and quantification of sterylglucosides in biodiesel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 110(2), 120-126.
- Bondioli, P. (2009). Nature of some insoluble materials recovered from biodiesel samples. *Eur. J Lipid. Sci. Tech.*, 111(8), 814-821.
- Brito, F. D. O. (2013). *Desenvolvimento de usina de produção de biodiesel a partir de óleo de fritura usando simuladores de processo: aspectos operacionais e ambientais*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Bücker, F., Santestevan, N. A., Roesch, L. F., Jacques, R. J. S., Peralba, M. C. R., Camargo, F. A. O. et al. (2011). Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 65, 172–178.
- Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The utilization of hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.*, 41, 653–673.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., & Marty, A. (2012). Lipases: an overview. In: Sandoval G. (eds) Lipases and Phospholipases. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 861, 3-30.

- Cazarolli, J. C., Guzatto, R., Samios, D., Peralba, M. D. C. R., Cavalcanti, E. H. D. S., & Bento, F. M. (2014). Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 95, 364-372.
- Cazarolli, J. C., de Quadros, P. D., Bücke, F., Santiago, M. R. F., Piatnicki, C. M. S., Peralba, M. D. et al. (2016). Microbial growth in *Acrocomia aculeata* pulp oil, *Jatropha curcas* oil, and their respective biodiesels under simulated storage conditions. *Biofuel Research Journal*, 3(4), 514-520.
- Deshpande, M. S., Rale, V. B., & Lynch, J. M., 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(7), 514-527.
- Dunn, R. O. (2012). Effects of monoacylglycerols on the cold flow properties of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 89(8), 1509-1520.
- Erinç, H., Tekin, A., & Özcan, M. M. (2009). Determination of fatty acid, tocopherol and phytosterol contents of the oils of various poppy (*Papaver somniferum* L.) seeds. *Grasas y Aceites*, 60(4), 375-381.
- Fernandes Jr., V. J., Araujo, A. S., Vinhado, F. S., & Pivesso, P. R. (2012). Caracterização de resíduo sólido formado em biodiesel de sebo bovino. *Quim. Nova*, 35(10), 1901-1906.
- Ferreira, M. E., & Grattapaglia, D. (1996). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. EMBRAPA-CENARGEN.
- Ferreira, L., Rosales, E., Danko, A. S., Sanromán, M. A., & Pazos, M. M. (2016). *Bacillus thuringiensis* a promising bacterium for degrading emerging pollutants. *Process Saf. Environ. Prot.*, 101, 19-26.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotech. Adv.*, 27(6), 782-798.
- Hausmann, S., & Jaeger, K. E. (2010). Lipolytic Enzymes from Bacteria. In: Timmis, K. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1099-1126). Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- Kane, S. D. (2015). *Degradation of cellulosic material by Cellulomonas fimi*. Doctoral Dissertation, PhD School of Biological Sciences, The University of Edinburgh, Edinburgh.

- Khoury, R. R., Ebrahimi, D., Hejazi, L., Bucknall, M. P., Pickford, R., & Hibbert, D. B. (2011). Degradation of fatty acid methyl esters in biodiesels exposed to sunlight and seawater. *Fuel*, *90*(8), 2677-2683.
- Knothe, G., & Razon, L. F. (2017). Biodiesel fuels. *Prog. Energy Combust. Sci.*, *58*, 36-59.
- Liang, R., Duncan, K. E., Le Borgne, S., Davidova, I., Yakimov, M. M., & Suflita, J. M. (in press). Microbial activities in hydrocarbon-laden wastewaters: Impact on diesel fuel stability and the biocorrosion of carbon steel. *J. Biotechnol.*, 2017.
- Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2011). Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? *FoodSci. Technol.*, *31*(3), 603-613.
- Meneghetti, S. P., Meneghetti, M. R., & Brito, Y. C. (2013). A Reação de Transesterificação, Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel. *Rev. Virt. Quím.*, *5*(1), 63-73.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W. H. Freeman.
- Pavić, A., Stanković, S., Saljnikov, E., Krüger, D., Buscot, F., Tarkka, M. et al. (2013). Actinobacteria may influence white truffle (*Tuber magnatum* Pico) nutrition, ascocarp degradation and interactions with other soil fungi. *Fungal Ecol.*, *6*(6), 527-538.
- Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J., & Lampi, A. M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(7), 939-966.
- Pinho, D. M., Santos, V. O., dos Santos, V. M., Oliveira, M. C., da Silva, M. T., Piza, P. G. et al. (2014). Evaluating the use of EN 14078 for determination of biodiesel in diesel blends sold in the Brazilian market. *Fuel*, *136*, 136-142.
- Pinho, D. M. M., Suarez, P. A. Z., Meneghetti, S. M. P., & Rangel, E. T. (2016). Problemas de formação de borras durante a estocagem verificados após a obrigatoriedade do biodiesel e as possíveis causas. In Pinho, D. M. M., & Suarez, P. A. Z. (Orgs.), *Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle*. (1a. ed.). Brasília: CDT, UNB.
- Plata, V., Gauthier-Maradei, P., Romero-Bohórquez, A. R., Kafarov, V., & Castillo, E. (2015). Characterization of insoluble material isolated from Colombian palm oil

- biodiesel. *Biomass Bioenergy*, 74, 6-14.
- Qin, W., Zhu, Y., Fan, F., Wang, Y., Liu, X., Ding, A. et al. (2017). Biodegradation of benzo (a) pyrene by *Microbacterium* sp. strain under denitrification: Degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source. *Bioch. Eng. J.*, 121, 131-138.
- Soriano, A. U., Martins, L. F., Ventura, E. S. A., de Landa, F. H. T. G., Valoni, E. A., Faria, F. R. D. et al. (2015). Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 99, 102-114.
- Souza, M. M., Colla, T. S., Bücke, F., Ferrão, M. F., Te Huang, C., Andreatza, R. et al. (2016). Biodegradation potential of *Serratia marcescens* for diesel/biodiesel blends. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 110, 141-146.
- Verma, P., & Sharma, M. P. (2016). Review of process parameters for biodiesel production from different feedstocks. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 62, 1063-1071.
- Wu, S., Yassine, M. H., Suidan, M. T., & Venosa, A. D. (2015). Anaerobic biodegradation of soybean biodiesel and diesel blends under methanogenic conditions. *Water Res.*, 87, 395-402.
- Wu, S., Yassine, M. H., Suidan, M. T., & Venosa, A. D. (2016). Anaerobic biodegradation of soybean biodiesel and diesel blends under sulfate-reducing conditions. *Chemosphere*, 161, 382-389.
- Yadav, A., Manna, S., Pandiyan, K., Singh, A., Kumar, M., Chakdar, H. et al. (2016). Isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus* sp. from diesel fuel-contaminated site. *Microbiology (00262617)*, 85(1).
- Yaakob, Z., Narayanan, B. N., & Padikkaparambil, S. (2006). A review on the oxidation stability of biodiesel. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 35, 136-153.
- Zimmer, A. R., Oliboni, A., Viscardi, S. L., Teixeira, R. M., Ferrão, M. F., & Bento, F. M. (2017). Biodiesel blend (B10) treated with a multifunctional additive (biocide) under simulated stored conditions: a field and lab scale monitoring. *Biofuel Research Journal*, 4(2), 627-636.

Este artigo foi publicado no Journal of Brazilian Chemistry Society em 11 de abril de 2018, sob DOI nº 10.21577/0103-5053.20180078. Este mesmo artigo teve a honra de ser indicado à capa da edição do Journal.



Figura 7 - Capa do Journal of the Brazilian Chemical Society, volume 29, número 10, de outubro de 2018.



<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180078>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 29, No. 10, 2034-2045, 2018
Printed in Brazil - ©2018 Sociedade Brasileira de Química

Article

Nature of Insoluble Material Found in the Bottom of Soybean Biodiesel Storage Tank: Chemical and Microbiological Approach

Juciana C. Cazarolli,^a Gabriela Boelter,^a Amanda M. D. L. de Lima,^a Thaisa Hengles,^b Camilla Correa,^b Maria C. R. Peralba,^b Marco F. Ferrão,^{a,b} Eduardo H. S. Cavalcanti,^c Márcia V. Bisol,^d Kelly S. Bezerra,^a Nelson R. Antoniosi Filho^e and Fátima M. Bentor^a

^aLaboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis (LAB-BIO), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre-RS, Brazil

^bDepartamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970 Porto Alegre-RS, Brazil

^cDivisão de Corrosão e Degradação, Instituto Nacional de Tecnologia, Av. Venezuela, 82, Sala 608, 20081-312 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

^d3 Tentos/RS, Rodovia BR 285, km 461.5, Distrito Industrial, 98700-000 Ijuí-RS, Brazil

^eLaboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES), Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, CP 131, 74001-970 Goiânia-GO, Brazil

During biodiesel storage, chemical reactions may occur, producing sludges. The aim of this study was to characterize the chemical and microbial composition of the sludge found in a biodiesel storage tank. The material was collected in a biodiesel production plant. The sludge chemical characterization was performed by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, flame atomic absorption spectroscopy (FAAS), gas chromatography (GC), and the microbial investigation used culture-dependent techniques. The detriogenic potential of the native microbial community was evaluated using the sludge as a microbial inoculum in a 60 day experiment. The microbial growth, biodiesel degradation, pH alterations, and the detection of esters in the aqueous phase were evaluated. The chemical analysis indicated the sludge composition as fatty acids esters and metallic ions; sterols glycosides were not detected. Seven bacteria and five fungi species were obtained from the sludge. The microbial growth analysis indicated that the native community does not have high biodiesel detriogenic capacity.

Keywords: biodeterioration, infrared spectroscopy, microorganisms, sludge, soybean biodiesel

Introduction

The use of biofuels derived from renewable raw materials has been increasingly common in the global energy field. In Brazil, with the approval of law 11.097/2005,¹ on January 13, 2005, biodiesel has been added to petroleum diesel. Currently, the concentration of biodiesel in mineral diesel is 10% (B10), and the perspective is that this percentage will increase in the following years in the country. The national production of biodiesel occurs mainly by transesterification reaction using methanol.² The Brazilian National Agency of Petroleum, Natural Gas, and Biofuels (Agência Nacional do

*e-mail: mfferrao@gmail.com

Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, ANP) Resolution No. 45/2014³ (henceforward called ANP 45) describes the quality requirements for commercialized biodiesel.

Because it is commonly composed of fatty acid methyl esters (FAMES), biodiesel has a higher degradability than diesel. In case of an environmental accident, the higher degradability of biodiesel, when mixed with diesel, is advantageous. However, this feature can be a disadvantage in storage since it makes diesel/biodiesel blends more susceptible to microbial contamination.⁴ Biodiesel can also be composed of small amounts of other elements such as glycerol and some metallic ions. The ANP 45 determines the acceptable limit of concentrations of these substances in biodiesel.³ In addition, sterols glycosides from the

Figura 8 - Artigo da capa do Journal of the Brazilian Chemical Society, volume 29, número 10, de outubro de 2018.

5 PUBLICAÇÃO 2: POTENCIAL DETERIOGÊNICO DE *AUREOBASIDIUM PULLULANS* SOBRE BIODIESEL, DIESEL E A BLENDAS B20

Juciana Clarice Cazarolli^a, Thais Livramento Silva^a, Rodolfo Ribas^a, Mariane Rodrigues Lobato^a, Letícia Mateus Xavier^a, Tiane de Moura^a, Caroline Galeazzi^e, Priscila Dallé da Rosa^b, Diego Kenne^c, Ânderson Ramos Carvalho^d, Patrícia Valente^b, Tânia Mara Pizzolato^e, Camila Correa^e, Marco Flores Ferrão^e, Ana Paula Guedes Frazzon^a, Fátima Menezes Bento^a.

^a Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis (LABBIO), Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, N° 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, N° 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

^c Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9500, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS.

^d Laboratório de Micologia Aplicada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, N° 2752, CEP: 90610-000, Porto Alegre, RS.

^e Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, N° 9500, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

5.1 HIGHLIGHTS

A levedura *A. pullulans* foi capaz de crescer na presença de biodiesel, formando biomassa e degradando 10% dos ésteres.

Foi possível observar a produção de clamidósporos, vesículas de óleo e lipase induzidos pela presença de biodiesel.

O composto palmitaldeído foi identificado como um metabólito produzido pelo fungo durante o crescimento em biodiesel.

5.2 RESUMO

A presença e o crescimento de microrganismos em combustíveis fósseis e biocombustíveis durante a estocagem já é registrada na literatura desde o século passado. No entanto, nem toda a população microbiana prospectada pode apresentar significativa capacidade deterio gênica com o comprometimento da qualidade final dos combustíveis. Um fungo leveduriforme foi isolado de biodiesel de soja puro e identificado como *Aureobasidium pullulans*. O fungo foi avaliado quanto à sua

capacidade de crescer em biodiesel, em óleo diesel e em mistura de diesel e biodiesel (B20). As modificações morfológicas e metabólicas na presença de biodiesel e outros meios de cultura também foram avaliadas. O crescimento fúngico foi estimado pela biomassa produzida e por qPCR do gene 18S. Metabólitos oriundos do seu crescimento foram avaliados por SPME e pela análise do pH da fase aquosa. Já a produção de lipase, enzima envolvida em processos de degradação de biodiesel, foi avaliada por 25 dias e a morfologia dessa na presença de biodiesel foi examinada por Microscopia eletrônica de Varredura. Foi possível observar a produção de lipase durante 25 dias pelo isolado na presença de biodiesel. Além disso, o biodiesel provocou a produção de um biofilme pela levedura. A biomassa do microrganismo após 25 dias foi de $74,2 \pm 13,5$ mg e $12,3 \pm 3,7$ mg em biodiesel puro de soja e na mistura B20, respectivamente, apresentando 10% de degradação do grupo éster no biodiesel puro e sendo caracterizado neste estudo como uma espécie potencialmente deteriogênica.

5.3 INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis representaram o percentual de 43,2% de consumo na matriz energética brasileira em 2017 (MME, 2018). A troca de combustíveis fósseis por combustíveis renováveis vem sendo incentivada no Brasil desde a década de 1970, impulsionada pela crise do petróleo que forçou a busca por outras fontes de energia (Mattei, 2010; Lima et al., 2015). Com a aprovação da lei nº. 11.097 pelo Congresso Nacional, em 13 de janeiro de 2005, a adição de biodiesel ao diesel tornou-se uma medida mandatória. Atualmente, a proporção de biodiesel adicionada ao diesel é de 10% de biodiesel (B10), e a perspectiva é que essa proporção aumente, visto que, mais recentemente, o governo brasileiro aprovou, em dezembro de 2017, a lei nº. 13.576, a qual pretende reconhecer o papel estratégico de todos os tipos de biocombustíveis na matriz energética brasileira (RENOVABIO).

O biodiesel é definido como um combustível renovável e ambientalmente aceitável. Composto por ésteres de ácidos graxos, a produção desse é realizada principalmente pelo processo de transesterificação, uma reação entre um ácido graxo, de origem animal ou vegetal, e um álcool, geralmente de cadeia curta (metílico ou etílico). A utilização do biodiesel apresenta algumas vantagens, quando comparado

aos outros combustíveis, como, por exemplo, o diesel e a gasolina (Knothe & Razon, 2017). Muitos estudos enfatizam a biodegradabilidade do biodiesel e como isso pode influenciar a degradação de misturas com o diesel (Pasqualino et al., 2006; Bucker et al., 2011; Dodos et al., 2012; Bucker et al., 2014; Cazarolli et al., 2016). A presença de compostos como os ésteres de ácidos graxos, que podem ser facilmente reconhecidos pelas comunidades microbianas, torna o biodiesel mais biodegradável (Jakeria et al., 2014).

Atualmente, diversos estudos evidenciam o potencial deteriorogênico de várias espécies microbianas em combustíveis, como diesel, biodiesel e querosene por bactérias (Saadoun, 2002; Mojarad et al., 2016); fungos filamentosos (Bento et al., 2005; Saratale et al., 2007; Bucker et al., 2011; Cazarolli et al., 2014; Covino et al., 2015; Cazarolli et al., 2016), e leveduras (Itah et al., 2009; Soriano et al., 2015, Martin-Sanchez et al., 2018a).

O fungo *Aureobasidium pullulans* é uma levedura reconhecidamente classificada como uma levedura negra pela sua capacidade em produzir melanina (Singh et al., 2015; Prasongsuk et al., 2017). Este apresenta característica polimórfica, podendo apresentar crescimento, como células leveduriformes ou micélio, dependendo das condições ambientais. A coloração escura que a colônia adquire ao longo do crescimento, resultado da produção de melanina, é devido à formação de clamidósporos, os quais são uma estrutura de resistência (Singh et al., 2015). Os isolados de *A. pullulans* são considerados seguros para propósitos biotecnológicos e já foram caracterizados quanto ao potencial de produção de produtos naturais e à capacidade em produzir enzimas envolvidas em processos de biodegradação, como a lipase (Leathers et al., 2013; Prasongsuk et al., 2017).

Essa espécie pode ser encontrada nos mais variados ambientes: rochas, monumentos, ambientes naturais osmoticamente estressantes, como águas hipersalinas, e biofilmes microbianos em lava-louças (Botic et al., 2014). Tal fungo teve sua presença detectada em combustíveis (McNamara et al., 2005; Rauch et al., 2006; Lee et al., 2010; Allsopp et al., 2016), no entanto a capacidade deteriorogênica deste em combustíveis como o diesel e o biodiesel ainda não foi avaliada.

Com a introdução de biodiesel ao diesel no Brasil tem-se verificado uma maior suscetibilidade da nova mistura (diesel/biodiesel) à biodeterioração e instabilidade química, o que leva a um aumento na geração de sedimentos de

natureza biológica e/ou química, comprometendo a qualidade final do produto armazenado (Bücker et al. 2011; Bento et al. 2016; Pinho et al., 2016). Procedimentos como drenagens frequentes e limpeza dos tanques de armazenamento, medidas simples, traduzidas como Boas Práticas, são propostas na prevenção do crescimento microbiano nos tanques, conforme sugerido na norma ABNT NBR 15512 (Gaylarde et al., 1999, Bento et al., 2016; Beker et al., 2016). Os métodos químicos consistem no uso de produtos antimicrobianos, compostos químicos que quando adicionados a combustíveis podem inibir ou matar microrganismos contaminantes (Hill & Hill, 2008; Zimmer et al., 2013, Cazarolli et al., 2014; Bento et al., 2016; Luz et al., 2018).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de biodeterioração de um fungo leveduriforme em meio aquoso com biodiesel de soja comercial, diesel de petróleo e mistura B20, caracterizando o crescimento do fungo na presença desses compostos.

5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

5.4.1 Fungo

O fungo leveduriforme utilizado no estudo foi o *Aureobasidium pullulans*, pertencente ao filo Ascomycota. Ele foi isolado de biodiesel produzido a partir de óleo de soja proveniente de uma distribuidora de combustíveis.

Para a identificação, a levedura foi transferida para o meio Ágar Batata-Dextrose (extrato de batata 4 g L⁻¹; Dextrose 20 g L⁻¹, ágar 15 g L⁻¹; pH Final: 5,1 ± 0,2 a 25 °C), incubada por 3 dias a 30 °C e identificada por espectrometria de massas com um MALDI Biotyper 4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), utilizando o protocolo de transferência direta de acordo com as instruções do fabricante. Uma colônia isolada foi transferida diretamente para uma placa de aço inoxidável de 96 poços e deixada para secar ao ar. Sobre ela foi adicionada 1 µL de uma matriz proteica (Bruker Matrix HCCA; α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) e foi novamente deixada a secar. Em seguida foram realizadas as leituras em duplicata dos espectros de massa das amostras que foram comparados aos espectros do banco de dados do equipamento.

A identificação preliminar foi obtida por MALDI-TOF e, subsequentemente,

confirmada por sequenciamento. O DNA foi extraído de uma colônia isolada em placa de petri contendo meio Ágar Batata-Dextrose com uso do Kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen). A partir deste DNA foi realizada a amplificação por PCR da região ITS-5.8S-ITS2, sendo utilizado o Kit Platinum Supermix (Brasil) (Invitrogen) com os primers ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTCGCG) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), gerando um produto de 550 pb. A reação de PCR foi realizada com 5 µL de Tampão de PCR 10X, 2,5 µL de solução MgCl₂ (50 mM), 200 mM dNTPs, 100 mM de cada primer, 2,5 U de Taq DNA polimerase e aproximadamente 50 ng de DNA, em um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada com uma temperatura de denaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 45 s, 54 °C por 45 s, e 72 °C por 90 s. Uma etapa final de alongamento por 7 min a 72 °C foi realizada. O produto de PCR foi purificado com auxílio do Kit PureLink™ PCR Purification (Invitrogen). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Reaction kit (Applied BioSystems, Foster City, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as análises dos fragmentos foram processadas com o sequenciador automático ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied BioSystems, Foster City, CA). A sequência gerada foi comparada às do banco de dados GenBank (ferramenta on-line disponível em <http://blast.be-md.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5.4.2 Inóculos

Os inóculos utilizados neste trabalho foram obtidos de duas formas diferentes e denominados de Inóculo 1 e Inóculo 2, dependendo da intenção de uso nos experimentos descritos a seguir.

5.4.2.1 Inóculo 1

O inóculo 1 foi preparado com auxílio de uma alça microbiológica. Nesta, uma colônia de um cultivo prévio foi colocada em frascos contendo caldo batata-dextrose que foram deixados em agitação por 3 dias a 30°C. Posteriormente, o caldo foi centrifugado a 6000 rpm, a 10 °C, por 20 min. O pellet foi lavado com uma solução salina (0,85%), centrifugado novamente e após ressuspendido em 20 mL de solução

salina. A solução de células permaneceu em agitação por 24 h com o intuito de esgotar possíveis reservas nutritivas que a célula leveduriforme poderia conter (técnica de *starvation*). Após esse período, a concentração do inóculo foi determinada pela contagem das células presentes na solução, em Câmara de Neubauer, para que a concentração final do experimento fosse de 10^3 células mL⁻¹.

5.4.2.2 Inóculo 2

O inóculo 2 foi preparado a partir de colônias obtidas por semeadura em placas de meio BDA com 4 dias de incubação. Uma porção das colônias isoladas contidas no meio de cultura foi obtida com o auxílio de uma alça microbiológica descartável padrão de 1 µL (Marca Cral). Essa porção foi adicionada à 1 mL de solução salina (0,85%) estéril e agitada em vortex com o intuito de diluir as células na solução. Posteriormente, após a decantação dos aglomerados de células, a solução acima do sedimento foi removida (+/- 800 µL) e utilizada para contagem em câmara de Neubauer, para que seu uso não ultrapassasse o valor de 10^3 células mL⁻¹ em cada frasco.

5.4.3 Avaliação da Produção de Lipase pelo Isolado *Aureobasidium pullulans*

Para avaliar a produção de lipase (E.C. 3.1.1.1) pela levedura, um microcosmos foi montado contendo 15 mL de biodiesel e 60 mL de meio mínimo mineral Bushnell e Haas (1941) (meio BH), em triplicata. O inóculo foi preparado de acordo com o item 5.4.2.1 e adicionado aos frascos. O experimento foi incubado em agitador orbital, a 90 rpm, a 30°C. As análises foram realizadas durante 25 dias nos seguintes tempos amostrais: 0, 24, 48, 72, 120, 168, 240, 360, 480 e 600 h. A cada tempo amostral uma alíquota do meio mínimo mineral foi coletada e avaliada para a produção da enzima lipase de acordo com Winkler e Stuckmann (1979), pela metodologia do *p-nitrofenilpalmitato* (p-NPP, massa molecular = 377,5 g Mol⁻¹, substrato para a enzima, ≥98 %, Marca Sigma-Aldrich), na presença e na ausência de células após centrifugação por 3 min a 10000 rpm. Uma unidade de lipase foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a produção de 1 µmol por minuto de

p-nitrofenol, de coloração amarela, nas condições estabelecidas (pH 8,0, 37°C, 30 min).

5.4.4 Detecção de Genes de Lipases/Carboxilesterases

O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para identificar os genes potenciais responsáveis pela produção de enzimas degradadoras de biodiesel no isolado *A. pullulans* foi baseado na amplificação de um gene de cópia simples de uma carboxilesterase (sinônimo de lipase E.C. 3.1.1.1). Para o desenho do oligonucleotídeo da carboxilesterase foi realizada uma busca inicial no banco de dados GenBank, no qual foi encontrado um exemplar da mesma espécie com genoma completo sequenciado (*Aureobasidium pullulans* EXF-150; Bioproject: PRJNA207874). Foi realizada uma busca e seleção de sequências relativas à carboxilesterases no genoma e, após, por meio da análise da CDS, prosseguiu-se ao site MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/>) pelo link presente no registro. Neste site as sequências foram analisadas e, posteriormente, com o auxílio da ferramenta de desenho de oligonucleotídeos do Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome), foram obtidos os oligonucleotídeos relacionados na Tabela 1, os quais amplificariam uma porção de cada gene encontrado.

Tabela 1 - Primers desenhados tendo como alvos carboxilesterases (E.C. 3.1.1.1) baseados no genoma de mesma espécie (*A. pullulans*) depositado no banco de dados NCBI, sob o código de Bioproject: PRJNA207874.

Código GenBank	Primer Obtido (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	
KL584976.1	76 Forward primer	TCAACTGTCAACGATGGGGG	194
	76 Reverse primer	GCCTCCGTGTATCCAAACCA	
KL584977.1	77 Forward primer	TGATGTCGCTCACATCCCTG	233
	77 Reverse primer	TCTCAGTACCGTGAGTGGGT	
KL584979.1	79 Forward primer	ACGTCCAAGTTCACGACCTC	198
	79 Reverse primer	AGCCTTGACCCAAACCACAA	
KL584980.1	80 Forward primer	CGTCATCGATGGCACGTTTC	234
	80 Reverse primer	CGCATTCTATCACGGTCCGA	
KL584995.1	95 Forward primer	TCGAGCAAAGTACGGTGTCC	201
	95 Reverse primer	AATGCAGCCCAAGCTCTCAT	

Após o desenho dos oligonucleotídeos foi realizado uma PCR, com o mesmo DNA extraído no item 5.4.1, com o objetivo de detectar qual dos genes oriundos da mesma espécie, mas com origem diferente, era presente na amostra alvo do estudo. Iniciou-se a avaliação variando as condições da PCR com uma curva de concentrações crescentes de $MgCl_2$, cofator da enzima Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen), variando de 1,5 a 3 mM. Também foram variadas as quantidades de oligonucleotídeos (0,2 a 0,4 μM), DNTPs (0,2 a 1 mM), DNA (10 a 400 $ng \mu L^{-1}$) e temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos (54°C a 50°C).

Os oligonucleotídeos que apresentaram amplificação tiveram seus produtos da PCR sequenciados por Sanger e posteriormente comparados com a sequência alvo do organismo *Aureobasidium pullulans* EXF-150; Bioproject: PRJNA207874, tanto a nível de nucleotídeos quanto a nível de aminoácidos, com o auxílio das ferramentas Nucleotide Blast, Blastx e Protein Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), bem como das plataformas Kalign, MView (www.ebi.ac.uk) e Translate Tool do ExPASy Bioinformatics Research portal (www.expasy.org/).

5.4.5 Produção de Vesículas de Óleo na Presença de Duas Fontes de Carbono Distintas

A capacidade da levedura *Aureobasidium pullulans* em acumular óleo durante seu crescimento foi avaliada e comparada a outras duas leveduras do acervo do laboratório LABBIO: *Meyerozyma guilliermondii* LABBIO16 (código Genbank: MH047241) e *Rhodotorula mucilaginosa* LABBIO18 (código Genbank: MK078575). O experimento foi realizado em duplicata em frascos erlenmeyers com capacidade para 250 mL contendo 100 mL de um meio confeccionado com 10% de glicose, 0,1% de $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% de KH_2PO_4 e 0,05% de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Meio A), de acordo com Rosa et al. (2014). Como fonte de carbono alternativa, a glicose foi substituída por 10% de biodiesel de soja comercial (Meio B). A cada meio foi adicionado um inóculo das leveduras já mencionadas, confeccionados de acordo com o item 5.4.2.2. Posteriormente, os frascos foram mantidos durante 72 h em agitador orbital (IKA, KS 4000, IKA®Works Inc., Rio de Janeiro, Brasil) a 150 rpm e 30 °C.

Após 72 h uma alíquota de 1 mL do meio foi coletada e centrifugada por 3-

5 minutos a 5000 rpm, sendo o sobrenadante removido e as células ressuspensas e lavadas em 1 mL de Tween 80 (0,01%). Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra com o intuito de remover potenciais gotas de ésteres presentes no biodiesel em meio às células, as quais poderiam comprometer a visualização das vesículas lipídicas. Ao final desta etapa as células foram ressuspensas em 250 µL de Tween 80 0,01%. Com esta suspensão foi preparado um esfregaço (10 µL da suspensão) em uma lâmina, deixando-a secar ao ar. Subsequentemente, 10 µL da solução estoque de vermelho de Nilo (0,1 mg de vermelho de Nilo para 1 mL de acetona) foi adicionada ao esfregaço com o objetivo de corar os lipídeos acumulados dentro das células das leveduras, permanecendo assim durante 5 minutos ao abrigo da luz. Posteriormente, a lâmina foi lavada com água destilada para a retirada do excesso de corante e analisada em microscópio de fluorescência com luz UV (450 – 500 nm), com aumento de 400x.

Com o objetivo de quantificar a produção de vesículas lipídicas foi realizado uma extração do óleo com protocolo adaptado de Bligh e Dyer (1959) a partir da biomassa total formada em ambos os meios (A e B). Para tal, todo o conteúdo dos frascos foi centrifugado em tubos de 50 mL (6000 rpm, 5 min) e o sedimento lavado com uma solução com Tween 80 (0,01%), procedimento repetido três vezes. Posteriormente, o pellet foi congelado em freezer a -80 °C e liofilizado. O crescimento das leveduras foi então quantificado por método gravimétrico, sendo descontado o valor inicial de cada tubo do valor final com a biomassa seca.

Após a pesagem, clorofórmio e metanol foram adicionados à biomassa liofilizada na proporção de 1:2. Essa solução foi, então, cisalhada na presença de gelo com o auxílio de um homogeneizador Turrax (ULTRA-TURRAX T18; IKA, São Paulo, Brasil) (3 vezes de 2 min). Posteriormente, os tubos permaneceram sob agitação durante 30 min (150 rpm) e à cada tubo foi adicionado mais um volume de clorofórmio contendo 0,02% de BHT (antioxidante) e sulfato de sódio anidro a 1,5% (na proporção de 1:1). Essa solução foi misturada em agitador orbital por 2 min e centrifugada a 6000 rpm a 15°C por 5 minutos. Subsequentemente, a fase inferior foi transferida com cuidado, usando pipeta Pasteur para tubos tipo Falcon de 15 mL contendo 1g de sulfato de sódio anidro. Após agitar por inversão o tubo, todo o seu conteúdo foi filtrado em discos de papel filtro em novos tubos de 50 mL, onde foram deixados para evaporar a fase clorofórmica em estufa a 50 °C até que seu peso não demonstrasse

mais alteração, sendo mantido em dessecador durante 24h para a pesagem.

5.4.6 Morfologia Celular da Levedura em Diferentes Substratos por Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia celular da levedura foi avaliada na presença de diferentes fontes de carbono. Um inóculo da levedura *A. pullulans* foi preparado de acordo com o item 5.4.2.1 e adicionado a frascos contendo meio mínimo mineral e biodiesel (15 mL de cada), caldo GYMP (30 mL), caldo batata dextrose (30 mL) e uma lamínula de vidro (24 mm x 32 mm), usada para permitir a aderência celular e facilitar a visualização por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Após 15 dias foi avaliada a presença de cápsula para os meios GYMP e na presença de Biodiesel, quando foi adicionado à uma alíquota do crescimento microbiano uma gota de tinta Nanquim para que fossem visualizadas, em microscópio óptico, estruturas reconhecidas como cápsula polissacarídea (ANVISA, 2016). Ao mesmo tempo amostral, para visualização em MEV, a lamínula foi removida com cuidado e colocada imersa em uma solução de glutaraldeído 3% e tampão fosfato 0,1 M (pH 7.2) para fixação da amostra, conforme protocolo adaptado de Silva et al. (2014), durante 2 semanas.

As amostras, então, passaram por três lavagens em tampão fosfato 100 mM e foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona. A dessecação foi realizada pela técnica de ponto crítico CO₂ (CPD 030 Balzers, Liechtenstein). As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio e metalizadas com ouro (SCD050 Balzers, Liechtenstein) para a visualização em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6060, usando o modo de emissão de elétrons secundários com tensões de aceleração de 10 kV e ampliações de 300x, 2.700x e 20.000x.

5.4.7 Curva de Crescimento do *A. pullulans* em Biodiesel de Soja, em Diesel de Petróleo e na Mistura B20

A curva de crescimento foi montada em frascos de vidro com 60 mL de meio mineral. Após a sua esterilização, adicionou-se 15 mL de cada fase oleosa em condições assépticas. As fases oleosas utilizadas foram biodiesel de soja comercial

puro (B100), diesel de petróleo puro (B0) e uma mistura contendo 20% de biodiesel adicionado ao diesel (B20). Estas foram esterilizadas por meio de um sistema de filtração a vácuo em frasco Kitassato com membranas de porosidade de 0,22 µm (marca Milipore). O experimento foi realizado em triplicata, e os frascos foram mantidos no escuro durante todo o experimento para evitar a fotoxidação do combustível. O inóculo da levedura foi adicionado à metade dos frascos de cultivo do experimento em concentração de 10^3 esporos mL⁻¹. Os frascos nos quais não foram adicionados inóculos foram considerados como controles. Os experimentos foram incubados em agitador orbital a 90 rpm a 30 °C. As análises foram realizadas durante 25 dias nos seguintes tempos amostrais: 0, 8, 24, 48, 72, 120, 168, 360, 600 horas. Em cada tempo amostral alíquotas da fase aquosa e oleosa foram retiradas para a realização de análises.

5.4.7.1 Quantificações do crescimento fúngico

5.4.7.1.1 PCR Real Time

A técnica de qPCR foi utilizada para a quantificação absoluta do número de cópias do gene 18S na biomassa formada pela levedura *A. pullulans* na interface óleo-água às 0, 8, 24, 48, 72, 120, 168, 360, 600 horas.

Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para quantificar o crescimento da levedura *A. pullulans* foram baseados na amplificação parcial da região V4 e V5 do gene 18S rRNA, de acordo com Bücken et al. (2014). O número de cópias do gene 18S rRNA em cada amostra foram quantificados por qPCR utilizando SYBR® Select MasterMix (Invitrogen, São Paulo, Brasil) em placas ópticas de 96 poços MicroAmp Fast Optical (0,1 mL) (Applied Biosystems®, São Paulo, Brasil) no equipamento StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®, São Paulo, Brasil).

A amplificação foi realizada de acordo com Bücken et al. (2014), em triplicata, em reações de 10 µL, contendo 1 µL de DNA (0,2 a 0,5 ng µL⁻¹), 0,15 µM de cada primer (forward e reverse), 5 µL do MasterMix e água ultrapura estéril (água para Injeção) para completar a reação. As condições de amplificação foram 2 min a 50 °C e 2 min a 95 °C seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 s; 56 °C por 30 s e 60 °C por

30 s.

O número de cópias do gene alvo foi calculado a partir da padronização de curvas (curva padrão) contendo concentrações conhecidas dos respectivos oligonucleotídeos controles (gDNA) em diluições seriadas de 1:10, em triplicata e com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,998. A especificidade da amplificação por PCR foi determinada pelas curvas de *melting*.

5.4.7.1.2 Biomassa formada pela levedura *A. pullulans* (peso seco)

Aos 25 dias, a biomassa formada na interface óleo/água foi avaliada por microscopia óptica com o intuito de visualizar potenciais modificações causadas pela fonte de carbono. Ao tempo final de avaliação foi realizada a separação das fases aquosa e oleosa de cada frasco com auxílio de um funil de separação. A biomassa formada na interface óleo/água foi removida dos frascos e avaliada por meio de pesagem, sendo filtrada em um sistema a vácuo com discos de papel filtro (Marca J.Prolab, gramatura 80, espessura 205 μm , porosidade 14 μm). Os discos foram mantidos em estufa a 30 °C por 7 dias previamente à filtração, conservados em dessecador até o seu uso, e pesados em balança de precisão (Marca Marte – modelo AL200C). Após a retenção da biomassa, 3 mL de hexano foram adicionados ao filtro para a remoção do excesso de óleo aderido à biomassa. Os discos foram então colocados em estufa a 30 °C durante 4 dias para secagem, sendo pesados novamente em uma balança de precisão, e retornados para estufa até que atingissem seu peso constante. Para o cálculo da biomassa produzida dos valores finais foram subtraídos os valores iniciais das membranas.

5.4.7.1.3 Análises da fase aquosa

Após a separação das fases aquosa e oleosa, a fase aquosa foi armazenada em frascos plásticos estéreis de 15 mL. Foram monitoradas possíveis modificações no pH da fase aquosa como indicativo da presença de metabólitos ácidos produzidos durante o crescimento fúngico. As medidas dos valores de pH foram realizadas aos 25 dias à temperatura ambiente com o auxílio de um pHmetro digital da Digimed, modelo DM-22A. Aos tempos 3 e 25 dias, alíquotas de 2 mL da

fase aquosa foram coletadas e filtradas com auxílio de filtros de seringa de PTFE, sendo feitas a microextração em fase sólida e a cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas.

5.4.7.1.4 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 com 2 mL de amostras de fase aquosa. Foi utilizada uma fibra de PDMS (Polidimetilsiloxano) e aquecimento da amostra a 60 °C por 15 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). As condições de análise do aparelho foram: $T_{\text{injetor}} = 250$ °C, forno com $T_{\text{inicial}} = 70$ °C, por 2 min, seguido de aquecimento de 10 °C/min até 200 °C, por 5 min, seguido das taxas de 10 °C/min até 270°C e mantendo esta temperatura por 8 min.

Os compostos presentes na amostra foram tentativamente identificados por comparação dos seus espectros de massas com aqueles da biblioteca NIST. Esta análise visou 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.

5.4.7.2 Análises da Fase Oleosa

5.4.7.2.1 Escala Haze

O impacto do crescimento da levedura na turbidez (e/ou a presença do pigmento escuro) das fases oleosas foi avaliado nas amostras aos 0 e 25 dias, de acordo com a norma ASTM D4176 – 04 (2014).

5.4.7.2.2 Infravermelho

Os tempos iniciais e finais da fase oleosa foram avaliados por espectroscopia no infravermelho a fim de identificar possíveis mudanças nas cadeias carbônicas do biodiesel, causadas pelo crescimento microbiano. Para as análises de FT-IR/ATR foi utilizado um espectrofotômetro Agilent Cary, acoplado a um acessório de reflectância total (ATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). O espectro foi obtido em triplicata na faixa de 4000-750 cm^{-1} , em temperatura ambiente, com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

5.4.7.2.3 RMN

A fase oleosa também foi avaliada aos 0 e 25 dias quanto à degradação das cadeias de ésteres de ácidos graxos pelo fungo leveduriforme, utilizando a técnica de ^1H RMN em um aparelho Varian VNMRS 300 MHz ($H = 7,0 \text{ T}$). Aproximadamente, 15 mg de amostra de biodiesel foram solubilizadas em 0.5 mL de clorofórmio deuterado (CDCl_3) a 99,8% (Cambridge Isotope Laboratories, EUA). As condições de análise foram: pulso 90° e tempo de relaxação de 3 s. As amostras foram analisadas em triplicata.

5.4.8 Análises Estatísticas

Os dados obtidos neste trabalho foram estatisticamente analisados com auxílio do programa BioStat 5.0 (<https://www.analystsoft.com/br/products/biostat/>). Análises de variância e Teste de Tukey ao nível de 5% de significância foram realizadas com os resultados oriundos da produção de lipase, produção de vesículas de óleo, crescimento microbiano e pH. A avaliação dos dados gerados pela técnica de espectroscopia de infravermelho foi realizada com o auxílio do software Chemostat.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Identificação do Isolado

Tanto a identificação preliminar (Maldi-TOF) quanto a molecular do isolado realizada por amplificação da região ITS confirmou a espécie *Aureobasidium pullulans* (Query Cover 100% e ID 99%). A sequência gerada foi posteriormente adicionada ao banco de dados do NCBI (Genbank), sob o nome de *Aureobasidium pullulans* LABBIO17, podendo ser acessada sob o código MH047242.

O fungo *A. pullulans* tem sua presença associada a folhas de plantas, principalmente em frutos de *Vitis vinífera*, e seu papel em infecções clínicas de pacientes imunocomprometidos é frequentemente relatado (Singh et al., 2017; Bozoudi et al., 2018). Aquele teve a presença detectada em amostras de óleo diesel e, mais recentemente, em biodiesel, sendo que seu papel deteriogênico nesses combustíveis ainda não foi elucidado (Lutterbach & Galvão, 2010; Allsopp et al., 2016; Cazarolli et al., 2018).

5.5.2 Avaliação da Produção de Lipase pelo Isolado *Aureobasidium pullulans* e Triagem de Genes de Lipases Apresentadas Pelo Isolado

Durante 25 dias, a produção da enzima lipase pela levedura *A. pullulans* na presença de biodiesel como fonte de carbono foi observada. Os valores de lipase para cada tempo amostral são apresentados na Figura 1. Os dados obtidos por meio da técnica descrita por Winkler e Stuckmann (1979) mostram que a presença das células leveduriformes podem representar diferenças significativas na lipase quantificada.

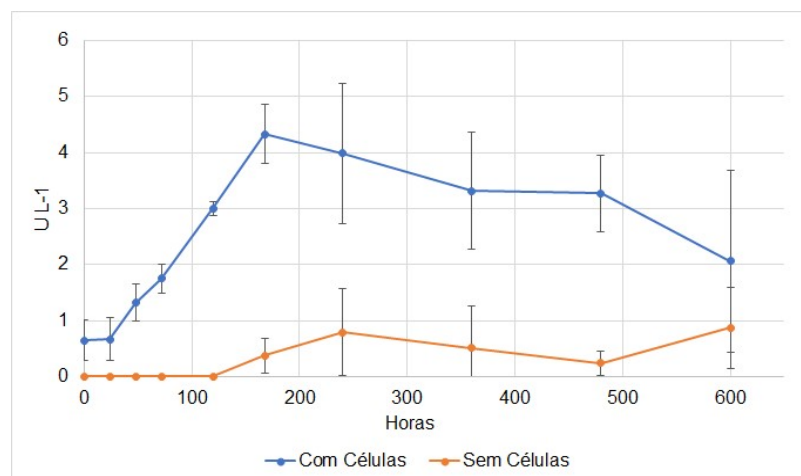


Figura 1 - Atividade de lipase por *A. pullulans* detectada nas condições determinadas.

Podemos observar que os maiores valores da produção da enzima lipase ($4,3 \pm 0,5 \text{ U L}^{-1}$) ocorreram às 168 h (7 dias) na presença das células, enquanto para o centrifugado esses valores representaram $0,4 \pm 0,3 \text{ U L}^{-1}$, durante o mesmo tempo amostral ($P < 0,05$). Ao final de 25 dias os resultados obtidos foram considerados similares estatisticamente ($P > 0,05$) para ambas as amostras, com e sem células ($2,0 \pm 1,6$ e $0,9 \pm 0,7 \text{ U L}^{-1}$, respectivamente).

Lipases fazem parte de um grupo diverso de hidrolases, enzimas as quais, juntamente com as esterases, realizam a clivagem e a formação de ligações ésteres, sendo o mecanismo para tal considerado o mesmo para ambas as enzimas (Schauer & Borriss, 2004). Segundo Jaeger e Reetz (1998) a lipase é uma carboxilesterase que catalisa a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa, majoritariamente ativa contra substratos insolúveis em água (principalmente óleos e gorduras), enquanto as esterases hidrolisam preferencialmente ésteres mais simples, com cadeias carbônicas menores que seis carbonos (Lopes et al., 2011; Bornscheuer, 2018).

Entre várias leveduras cuja produção de lipase tem sido relatada na literatura, cepas de *A. pullulans* têm sido consideradas eficientes quando o assunto é lipases extracelulares (Prasongsuk et al., 2017). Liu et al. (2008) classificaram a lipase avaliada e produzida pela cepa de *Aureobasidium pullulans* HN2.3 como extracelular. Esta cepa foi isolada de água do mar e na presença de óleo de oliva foi capaz de produzir $8,02 \pm 0,24 \text{ U mL}^{-1}$ em 96h.

Em outro experimento, 39 cepas, representando 12 clados filogenéticos de *Aureobasidium pullulans*, foram avaliadas quanto à produção de lipase com óleo de

oliva como indutor (Leathers et al., 2013). Utilizando a mesma técnica de detecção, na ausência de células, valores de $0,57 \pm 0,03 \text{ U mL}^{-1}$ foram observados para a cepa com melhor performance, tendo as demais apresentado valores menores ou ausência de atividade lipolítica relatada.

Microrganismos, de um modo geral, são capazes de produzir diversas lipases que podem estar localizadas em várias estruturas celulares e apresentar múltiplas propriedades (extracelular, ligada à membrana ou com atividade intracelular) (Vorapreeda et al., 2015). Nas condições testadas, a enzima detectada para o isolado LABBIO17 apresentou valores que a caracterizam como localizada ligada à membrana celular, sendo pouco secretada para o meio extracelular (Figura 1).

Bussamara et al. (2010) observaram a produção da enzima lipase na presença de gordura bovina e óleo de soja por várias espécies de leveduras. A levedura *Pseudozyma hubeiensis* HB85A com melhor performance apresentou $610,40 \pm 15,55$ e $385,6 \pm 21,7 \text{ U L}^{-1}$ em cada fonte oleosa, respectivamente. Quando comparada a outras quatro cepas diferentes de *A. pullulans* e *Aureobasidium* sp. (HB64, HB41, HB47 e HB07) valores de $5,36 \pm 0,04$, $5,93 \pm 0,38$ e $7,58 \pm 0,20 \text{ U L}^{-1}$ foram observados para a gordura bovina, e no óleo de soja não puderam ser detectadas atividades lipolíticas. Apenas para a cepa HB07 os valores encontrados foram de $90,48 \pm 4,30$ e $1,15 \pm 0,1 \text{ U L}^{-1}$ para gordura bovina e óleo de soja, respectivamente.

A transformação de lipídeos envolve principalmente enzimas como as lipases e algumas fosfolipases. Monoxigenases, lipoxigenases, álcool desidrogenases, hidratases e muitas outras enzimas também podem estar envolvidas nesse processo (Bornscheuer, 2017). Além de serem responsáveis pelo metabolismo de alcanos, ácidos graxos comuns podem ser oxidados por monoxigenases do citocromo P450, sendo convertidos em um ácido dicarboxílico, o qual, então, entra na β -oxidação, processo denominado de ω -oxidação. Amplamente documentado em leveduras, essa rota metabólica produz ácidos dicarboxílicos de cadeias medias e longas, os quais possuem uso comercial em perfumes, polímeros, lubrificantes de alta qualidade, etc.

Além disso, os intermediários da metabolização de alcanos e ácidos graxos pelas enzimas do citocromo P450 também podem ser importantes na formação de constituintes celulares como esfingolipídeos (Van Bogaert et al., 2010). De posse

dessas informações, pode-se sugerir que a lipase avaliada para o isolado *A. pullulans* pode ter preferência por outro substrato que não o utilizado durante a avaliação, bem como outros mecanismos enzimáticos podem estar sendo utilizados pela levedura para utilizar o carbono presente nos ésteres em seu crescimento.

Quando os genes de carboxilesterases foram avaliados apenas um par de primer apresentou amplificação positiva detectada por gel de agarose 1,5% (Figura 2). O primer desenhado com base na carboxilesterase com código KL584977.1 (primer 77) teve seu produto de PCR avaliado quanto à similaridade com a sequência alvo, proveniente da cepa de *Aureobasidium pullulans* EXF-150 (Bioproject: PRJNA207874). Foi observado um percentual de identidade de sequências (pid) de 79,4%. Além disso, esse produto foi traduzido para proteína com auxílio do portal ExpASY e teve seu frame de leitura (5'3' Frame 3) selecionado com a maior identidade (87%) com a sequência de proteínas alvo (5'3' Frame 1 – com similaridade 100% com a sequência completa KEQ86817.1). Ambos resultados estão expressos na Figura 3.

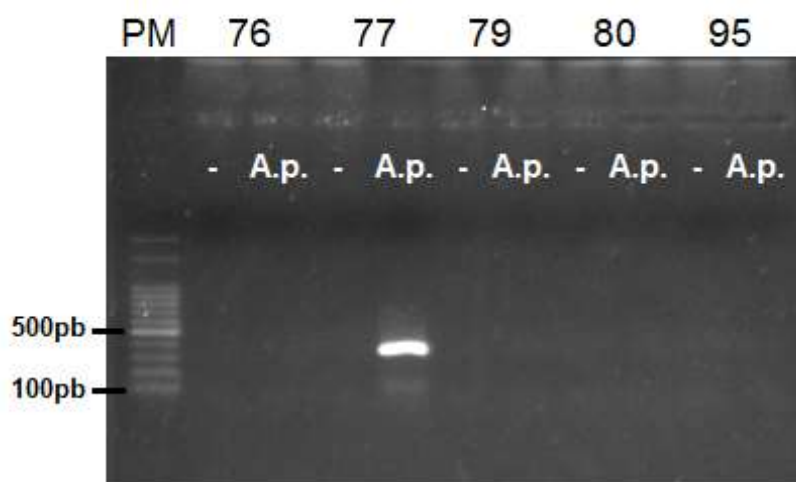
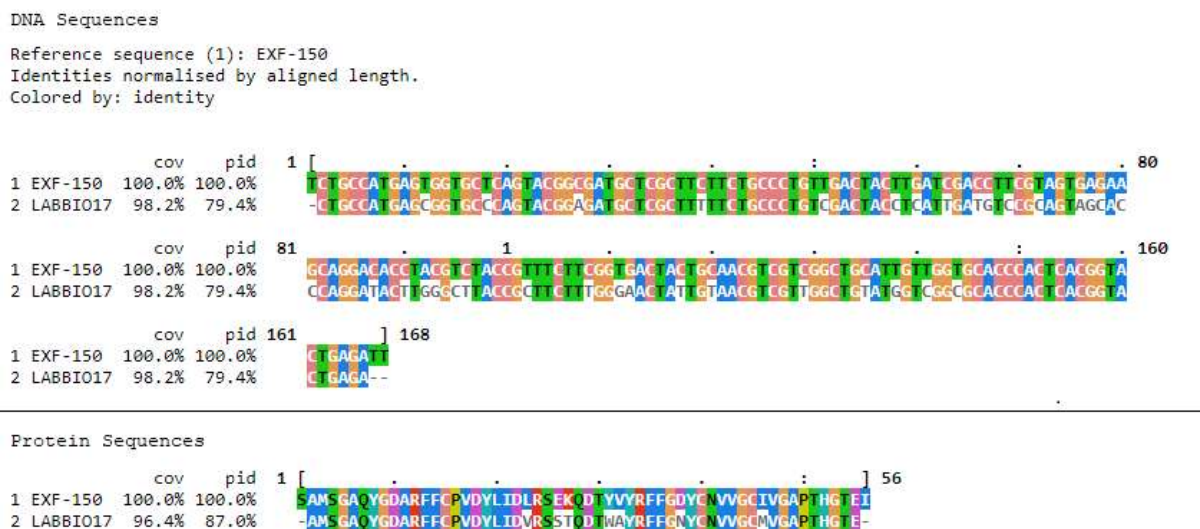


Figura 2 - Gel de agarose 1,5%, corado com Gelred e Bromofenol mostrando as amplificações detectadas para o conjunto de primers referentes à carboxilesterase (legenda: 76: conjunto de primer 76; 77: Conjunto de primer 77; 79: conjunto de primer 79; 80: conjunto de primer 80; 95: conjunto de primer 95; - : controle negativo; A.p.: DNA utilizado do *A. pullulans* LABBIO17; PM: peso molecular).



[MView 1.63](#), Copyright © 1997-2018 [Nigel P. Brown](#)

Figura 3 - Alinhamentos das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos gerados por comparação com a cepa *A. pullulans* EXF-150.

Gostinčar et al. (2014) analisaram os genomas de quatro variedades de *A. pullulans* e observaram um número de genes codificando para a enzima lipase, variável entre os isolados, sendo que a menor quantidade de genes descritos foi encontrada na cepa *A. pullulans* var. *melanogenum*. A variabilidade encontrada entre o isolado alvo desse estudo e o isolado usado como referência pode ser explicada pelas pressões seletivas que o ambiente pode causar no genoma de cepas da mesma espécie (Gerstein et al., 2006; Dhar et al., 2011; Gostinčar et al., 2014).

A presença de ésteres de ácidos graxos em excesso e de nutrientes limitados, típicos de um tanque de estocagem de combustível, por exemplo, podem servir como pressão seletiva para que esse microrganismo se desenvolva com competência suficiente para utilizar o carbono presente no biodiesel ou na fase aquosa como precursor de suas estruturas celulares.

5.5.3 Produção de Vesículas de Óleo na Presença de Duas Fontes de Carbono Distintas

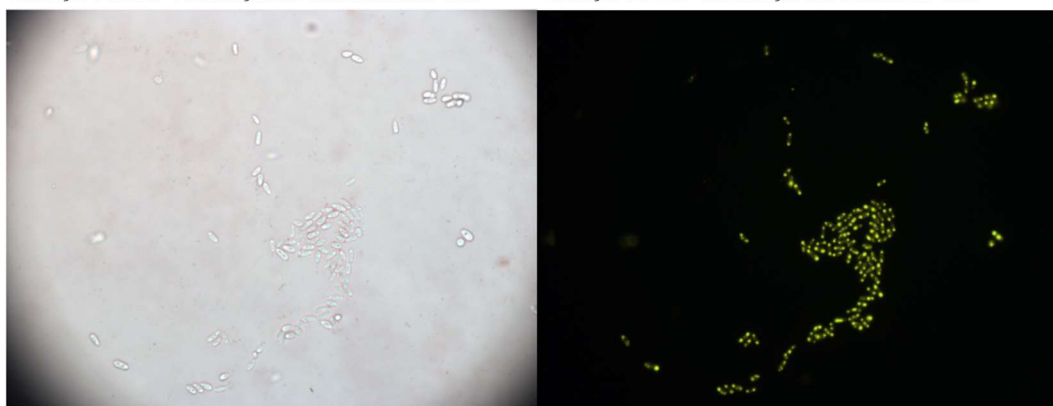
O acúmulo de lipídeos com diferentes fontes de carbono como indutores foi avaliado para a levedura *A. pullulans*, alvo deste estudo, e comparado a outras leveduras da coleção do laboratório. Pôde-se observar que a coloração de vermelho

de Nilo foi suficiente para detectar o conteúdo oleoso presente no citoplasma das leveduras durante o seu crescimento utilizando glicose e ésteres de ácidos graxos. Após 72 h de cultivo foi possível observar que as leveduras *A. pullulans* e *R. mucilaginosa* foram capazes de acumular lipídeos em ambas fontes de carbono (Figuras 4 e 5). A levedura *M. guilliermondii* não apresentou resultado positivo para o meio de cultura com glicose, porém quando a fonte de carbono mudou para biodiesel as vesículas foram observadas em aumento de 400x (Figura 6).

***Aureobasidium pullulans* - Meio A**

Coloração a fresco - Visualização Luz Branca Aumento 400x

Coloração a fresco - Visualização Luz UV Aumento 400x



***Aureobasidium pullulans* - Meio B**

Coloração a fresco - Visualização Luz Branca Aumento 400x

Coloração a fresco - Visualização Luz UV Aumento 400x

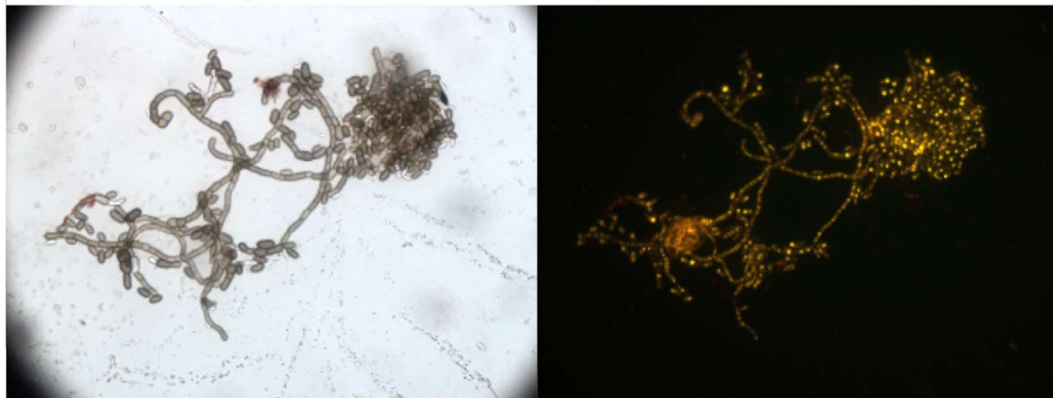
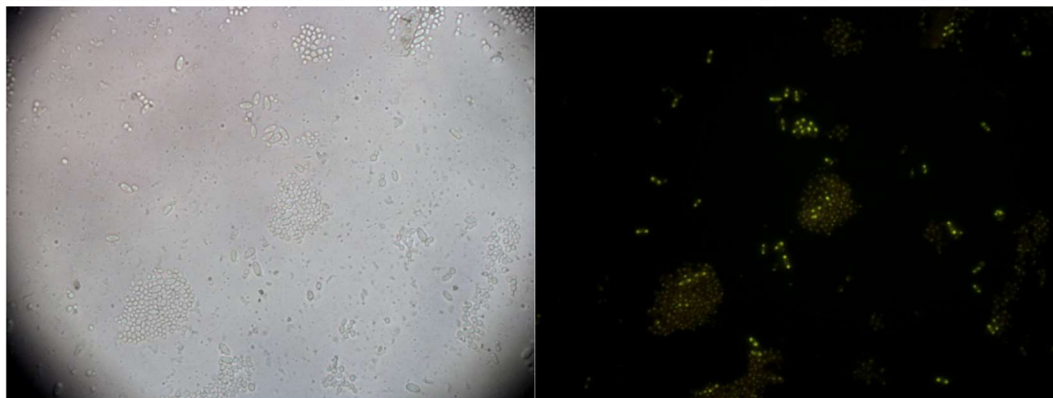


Figura 4 - Avaliação da produção de vesículas de óleo pela levedura *A. pullulans*.

***Rhodotorula mucilaginosa* - Meio A**

Coloração a fresco - Visualização Luz Branca Aumento 400x

Coloração a fresco - Visualização Luz UV Aumento 400x

***Rhodotorula mucilaginosa* - Meio B**

Coloração a fresco - Visualização Luz Branca Aumento 400x

Coloração a fresco - Visualização Luz UV Aumento 400x

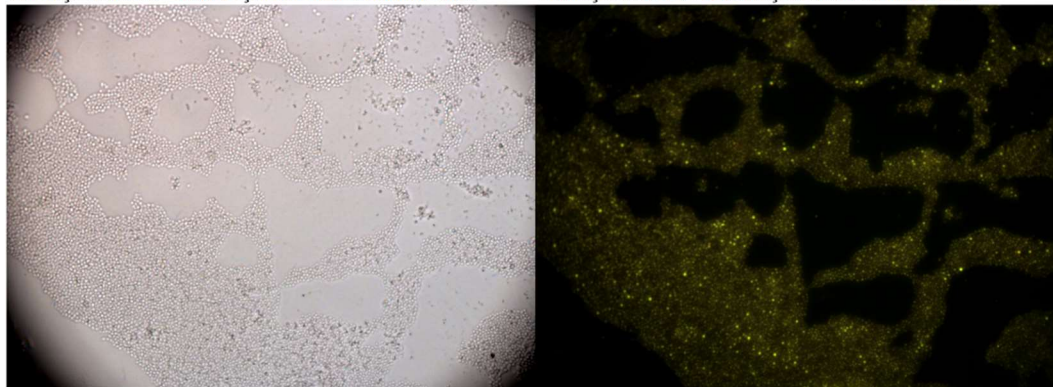
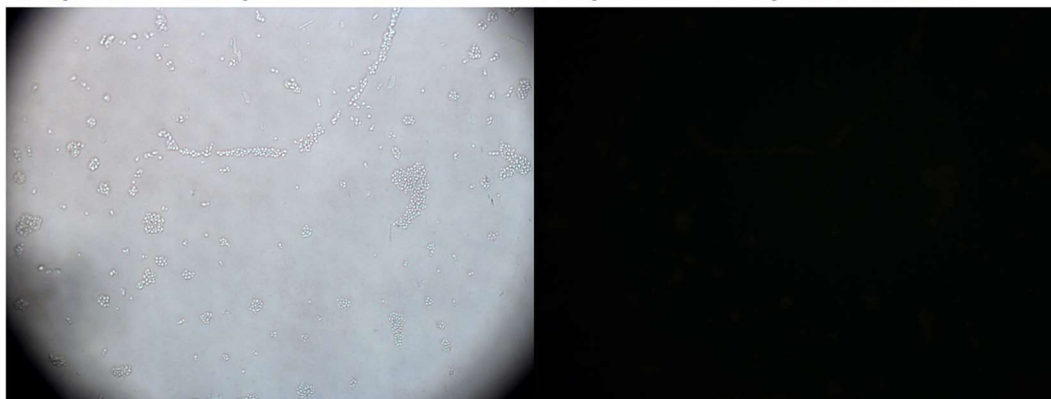


Figura 5 - Avaliação da produção de vesículas de óleo pela levedura *R. mucilaginosa*.

***Meyerozyma guilliermondii* - Meio A**

Coloração a fresco - Visualização Luz Branca Aumento 400x

Coloração a fresco - Visualização Luz UV Aumento 400x



***Meyerozyma guilliermondii* - Meio B**

Coloração a fresco - Visualização Luz Branca Aumento 400x

Coloração a fresco - Visualização Luz UV Aumento 400x

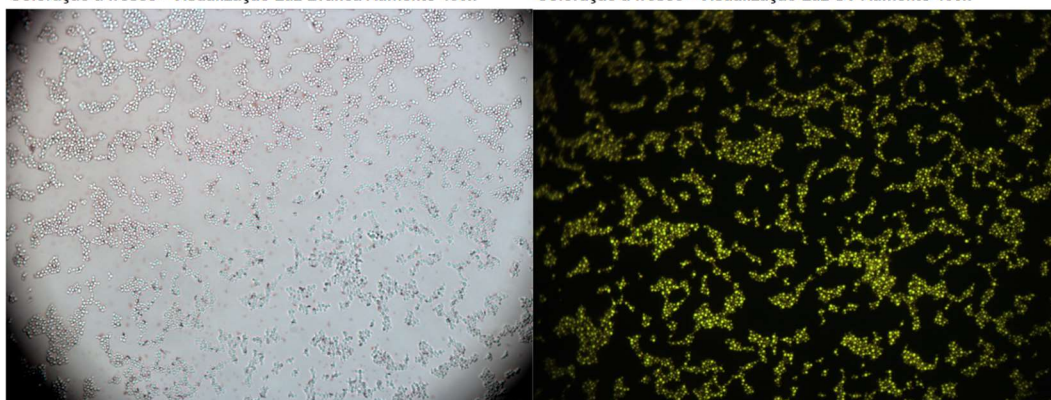


Figura 6 - Avaliação da produção de vesículas de óleo pela levedura *M. guilliermondii*.

A capacidade de leveduras de acumular lipídeos dentro de seu citoplasma é bem explorada pela literatura (Fakas, 2017; Graef, 2018). Esses são armazenados em estruturas intracelulares hidrofóbicas que podem ser denominadas de gotículas lipídicas, corpos lipídicos, corpos oleosos, glóbulos de óleo ou oleossomas. As funções dessas estruturas incluem armazenamento de energia, síntese lipídica, degradação, tráfico de vesículas, secreção de lipídios e sinalização celular baseada em lipídios (Goold et al., 2015; Pyc et al., 2017).

A biomassa formada em cada meio diferiu entre as leveduras e pode ser observada na Figura 7. A levedura *A. pullulans* apresentou diferenças significativas entre as fontes de carbono, sendo que a glicose favoreceu o seu crescimento ($179,3 \pm 6,8$ mg) ($P < 0,05$). Quando comparada às demais leveduras, essa foi a que menos cresceu com biodiesel como fonte de carbono, atingindo $20,4 \pm 0,7$ mg em 72 h, sendo que ao mesmo tempo esses valores atingiram $68,8 \pm 8,0$ mg ($P < 0,05$) para *M. guilliermondii*. Os valores de biomassa encontrados para esta levedura quando glicose

foi o substrato adicionado foram de $8,0 \pm 8,3$ mg. Para a levedura *R. mucilaginosa* não houve diferenças significativas entre as fontes de carbono utilizadas, sendo $52,6 \pm 26,4$ mg encontradas no meio com biodiesel e $10,2 \pm 4,2$ mg no meio com glicose como fonte de carbono ($P > 0,05$).

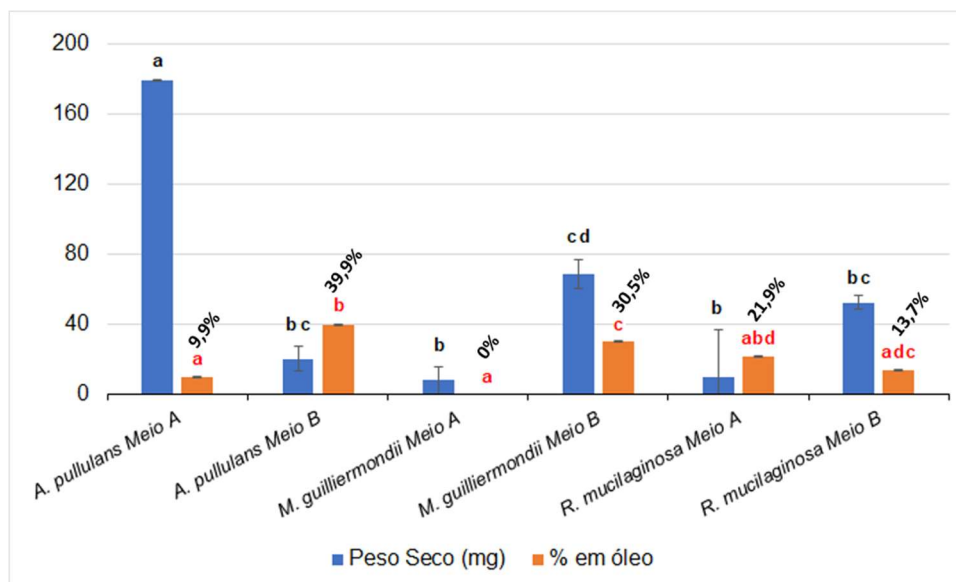


Figura 7 - Biomassa formada em cada fonte de carbono e porcentagem de óleo produzido para cada levedura. Em cada tratamento, separado por cores, valores entre os tratamentos com a mesma letra sobrescrita são estatisticamente indistinguíveis pelo Teste de Tukey, com $P > 0,05$.

Ao avaliarmos a porcentagem correspondente à massa lipídica do crescimento de cada levedura nos diferentes substratos podemos observar que para os isolados *A. pullulans* e *R. mucilaginosa* a maior biomassa não correspondeu com a maior porcentagem de óleo recuperado. O tamanho e a quantidade dos corpos lipídicos variam dependendo da espécie, estágio de crescimento e condições ambientais (Goold et al., 2015). Com os dados apresentados na Figura 7, podemos concluir que o substrato, a única variável entre os tratamentos, pode ter tido influência no tamanho e acúmulo desses corpos oleosos para essas duas leveduras, nas condições propostas. Além disso, para que a levedura seja considerada oleaginosa a produção de lipídeos deve superar de 20 a 25% o peso de sua biomassa. Sendo assim, o isolado *A. pullulans* LABBIO17 pode ser considerado uma levedura produtora de óleo com biodiesel como substrato (Dey & Maiti, 2013; Rosa et al., 2014).

O acúmulo de lipídeos em leveduras ocorre quando o nitrogênio se encontra limitado no meio de crescimento (Xue et al., 2018). Se a levedura não é capaz de estocar lipídeos, o carbono em excesso no meio pode ser transformado em

polissacarídeos de reserva, ao passo que, em espécies oleaginosas, a rota preferencialmente utilizada é a síntese lipídica (Rosa et al., 2014; Xue et al., 2018).

Zhou et al. (2013) avaliaram o potencial de uso da levedura *Rhodosporidium toruloides* no tratamento de águas residuais de bioetanol e o respectivo acúmulo de lipídeos durante o seu crescimento. A produção máxima de 27,7% de conteúdo lipídico em suas células foi observada durante o crescimento em águas residuais com alta DQO (Demanda Química de Oxigênio). Quando 1,2 g L⁻¹ de glicose foi adicionado, a produção de biomassa e lipídios pela levedura *R. toruloides* aumentou em 39,5% e 53,8%, respectivamente.

Os isolados *A. pullulans* e *R. mucilaginosa* obtiveram porcentagens de 9,9 ± 0,0% e 21,9 ± 0,08%, respectivamente, de óleo quando comparado à biomassa por eles formada quando o substrato utilizado em seu crescimento foi a glicose. O isolado *M. guilliermondii*, apesar de demonstrar crescimento em ambos os meios, foi incapaz de acumular óleo na presença de glicose, provavelmente pela disposição de fontes solúveis de carbono. Quando a fonte de carbono presente no meio foi modificada para ésteres de ácidos graxos, o biodiesel induziu a formação e o acúmulo de lipídeos pelos três isolados, sendo que as porcentagens detectadas foram de 39,9 ± 0,1%, 30,5 ± 0,03% e 13,9 ± 0,03% para *A. pullulans*, *M. guilliermondii* e *R. mucilaginosa*, respectivamente.

Liu et al. (2014) observaram o crescimento da levedura *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* em meio de cultura suplementado por 120,0 g L⁻¹ de glicose e 0,1 % licor de maceração de milho, no qual foram encontrados cerca de 22,5 g L⁻¹ de lipídeos secretados pelo fungo em questão. Manitchotpsit et al. (2011) reportaram que ao considerar mais de 50 variedades diferentes de *A. pullulans*, ao menos 21 cepas foram capazes de secretar óleos pesados. Neste trabalho foi observado o acúmulo de lipídeos pelas três leveduras em questão, sendo que o alvo do estudo, *A. pullulans*, apresentou corpos lipídicos em ambos meios utilizados e condições aplicadas.

5.5.4 Morfologia Celular da Levedura na Presença de Diferentes Substratos por Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia da levedura *A. pullulans* foi avaliada quanto a possíveis modificações causadas pela diferença da natureza dos substratos avaliados. Foi possível observar a formação de uma cápsula polissacarídea em ambos os substratos por meio da técnica que utiliza Nanquim como marcador da estrutura (Figura 8). Quando observado e detalhado com a microscopia eletrônica de varredura (MEV), confirmou-se a presença da cápsula encobrindo as células leveduriformes (Figura 9 – A.1). No meio BH contendo biodiesel como fonte de carbono foi observado a formação de uma biomassa na interface óleo-água na lamínula, a qual apresentou hifas, pseudo-hifas e células livres, todas interligadas com uma estrutura similar a uma matriz cristalizada, possivelmente produzida pela própria levedura (Figura 9 – B.1 e Figura 10).

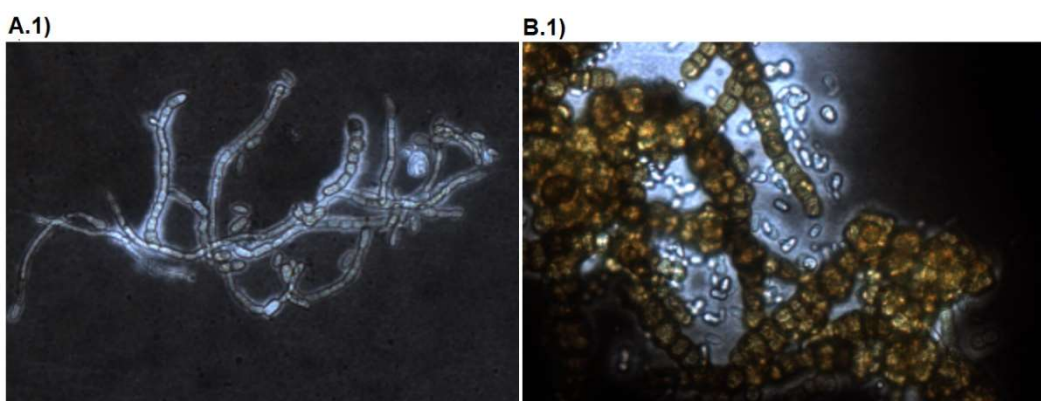


Figura 8 - Cápsula polissacarídea produzida pela levedura *A. pullulans* detectada por microscopia óptica no meio GYMP (A.1 – microscopia óptica com aumento de 400x) e na presença de biodiesel (B.1 - microscopia óptica com aumento de 400x).

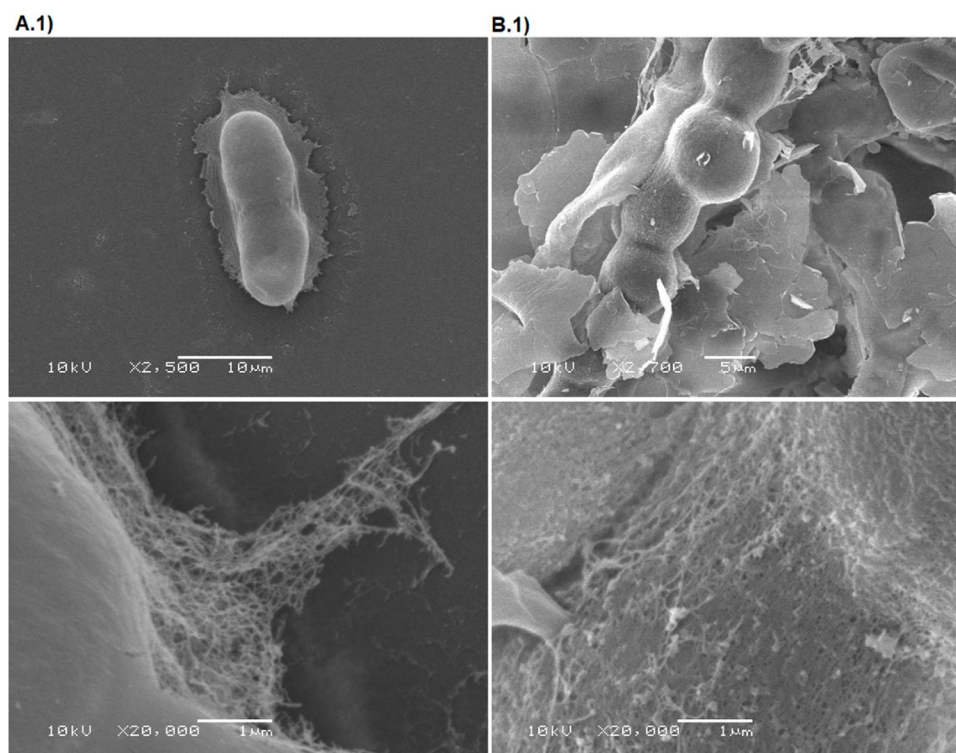


Figura 9 - Cápsula polissacarídea produzida pela levedura *A. pullulans* detectada por microscopia eletrônica de varredura no meio GYMP (A.1 – microscopia eletrônica de varredura com aumento de 2.500x e 20.000x) e na presença de biodiesel (B.1 – microscopia eletrônica de varredura com aumento de 2.700x e 20.000x).

No ambiente, microrganismos tendem a crescer em comunidades, formando aglomerados, os quais estão normalmente imersos em uma matriz polimérica secretada por um ou mais microrganismos. Esta estrutura pode ser chamada de biofilme, que naturalmente oferece proteção e pode auxiliar na adesão às superfícies, na agregação celular, no reconhecimento célula a célula e na retenção de água e nutrientes, constituindo uma barreira contra condições adversas ambientais (Salama et al., 2015). A estrutura do biofilme contém secreções celulares, caracterizadas por compostos como exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, fosfolipídeos e substâncias húmicas (Salama et al., 2015; Wachowska et al., 2016). A presença de um biofilme bem organizado, como demonstrado na Figura 10 – C, sugere que o biodiesel é capaz de induzir a formação de tal estrutura pelo isolado *A. pullulans*. Esta espécie demonstrou um alto potencial de crescimento em biodiesel puro, formando uma estrutura especializada de maneira superior ao observado em meios de cultura considerados ricos em nutrientes e com carbono de fácil assimilação (GYMP e BDA). A produção de biofilme na presença de biodiesel em tanques de estocagem já foi descrita pela literatura, sendo a presença de bactérias e fungos

observada para todos os tipos de combustíveis durante o armazenamento, predominantemente na interface água-combustível (Sorensen et al, 2011).

Ao observarmos o crescimento da levedura nas diferentes fontes de carbono pôde-se constatar algumas modificações morfológicas, possivelmente causadas pela disponibilidade de nutrientes do meio de cultivo. Com o meio GYMP, foi observado crescimento na forma de células livres de tamanhos variados, evidenciando o metabolismo leveduriforme e a produção das denominadas células inchadas, produtoras de melanina. As hifas e pseudo-hifas, também características de *A. pullulans*, foram encontradas apresentando uma estrutura em forma de rede sobre e entre suas células, possivelmente utilizada para aderência à lamínula utilizada durante o crescimento (Figura 10 – A).

Quando o meio base de crescimento BDA foi utilizado, a levedura apresentou o crescimento em forma de hifas e pseudo-hifas com uma origem em comum, o que evidencia um ponto de aderência dessa estrutura à superfície da lamínula (Figura 10 – B).

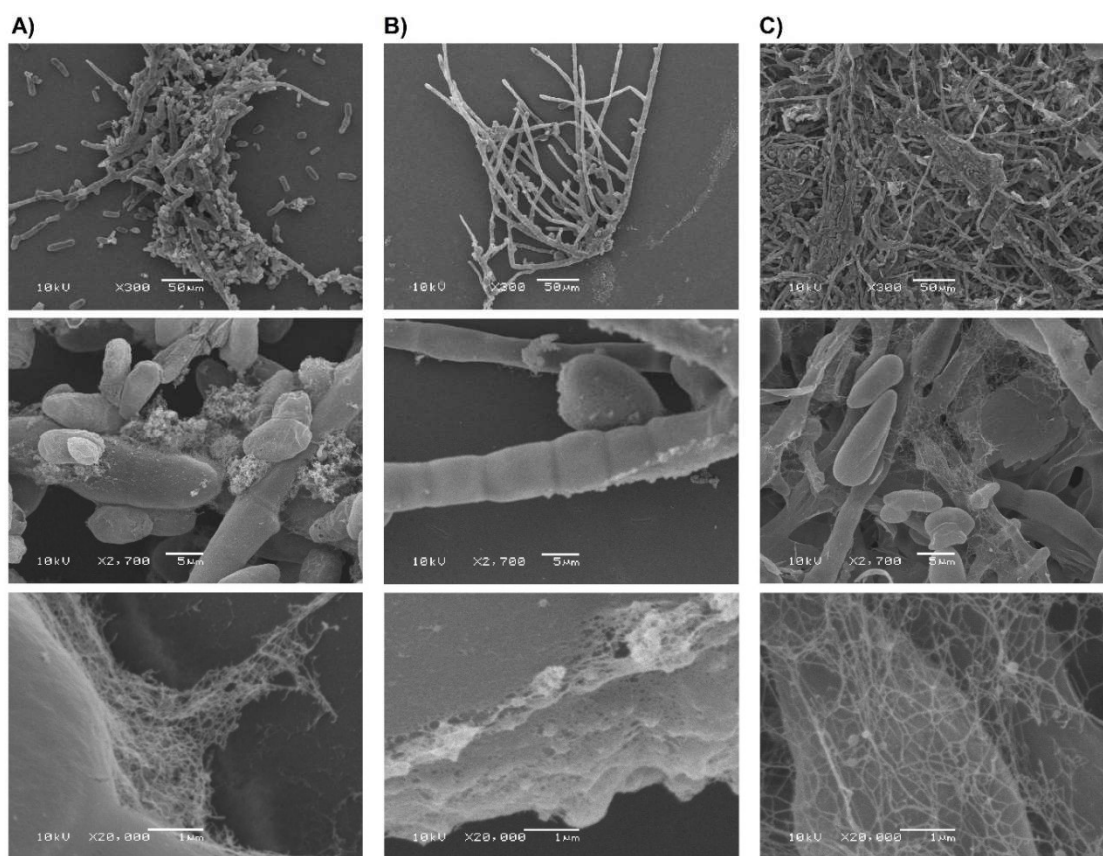


Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura do crescimento da levedura *A. pullulans* nas diferentes fontes de carbono, utilizando meio de cultura Gymp (A), meio BDA (B) e meio mínimo mineral com biodiesel (C).

A levedura *A. pullulans*, devido às suas características morfológicas, pode ser classificada como sendo dimórfica, ou seja, exibe um polimorfismo onde pode apresentar crescimento na forma de levedura de brotamento ou de um micélio, dependendo das condições ambientais (Deshpande et al., 1992; Bamadhaj et al., 2015; Prasongsuk et al., 2017). Em biodiesel, o crescimento se concentrou na região da interface óleo-água, onde pôde ser observada uma biomassa densa com a presença de todos os tipos de células e estruturas desenvolvidas pela levedura *A. pullulans*: hifas, pseudo-hifas e células leveduriformes, normais, de tamanho maior (células inchadas) e produtoras de melanina (clamidósporos).

A levedura *A. pullulans* produz naturalmente um polissacarídeo denominado de pululano, o qual é composto por unidades de polimaltotriose e pode ter sua produção afetada pelo tipo e pela concentração da fonte de nitrogênio do meio de cultura. Esse polissacarídeo é produzido pela célula de duas formas, um componente insolúvel que circula a célula e hifas, formando uma cápsula, e uma fração solúvel secretada para o meio (Andrews et al., 1994; Prasongsuk et al., 2017). O crescimento detectado neste trabalho com diferentes fontes de carbono demonstra as diferenças no desenvolvimento dessa levedura quanto à produção de polissacarídeo extracelular e composição da biomassa, evidenciadas pela literatura, com o acréscimo de informações acerca do comportamento da levedura como uma deteriogênica de biodiesel.

5.5.5 Curva de Crescimento da *Aureobasidium pullulans* em Biodiesel de Soja, em Diesel de Petróleo e na Mistura B20

5.5.5.1 Biomassa

Ao final de 25 dias foi possível observar diferenças no crescimento da levedura *A. pullulans* em diferentes proporções de diesel e biodiesel. Estes valores estão expressos na Tabela 2 e a aparência dos frascos está demonstrada na Figura 11.

Tabela 2 - Peso seco (mg), pH da fase aquosa e ASTM D4176 (Escala Haze) da fase oleosa recuperada dos frascos contendo crescimento da levedura *A. pullulans* em biodiesel puro (B100), diesel puro (B0) e mistura B20. Em cada coluna valores entre os tratamentos com a mesma letra sobrescrita são estatisticamente indistinguíveis pelo Teste de Tukey, com $P > 0.05$.

Tratamentos	Peso seco (mg)	pH
B100	74,2±13,5 ^a	5,6±0,12 ^a
B100 Controle	0,00	6,8±0,01 ^b
B20	12,0±3,7 ^b	5,7±0,08 ^a
B20 Controle	0,00	6,9±0,02 ^b
B0	4,1±0,5 ^b	6,9±0,06 ^b
B0 Controle	0,00	6,9±0,02 ^b

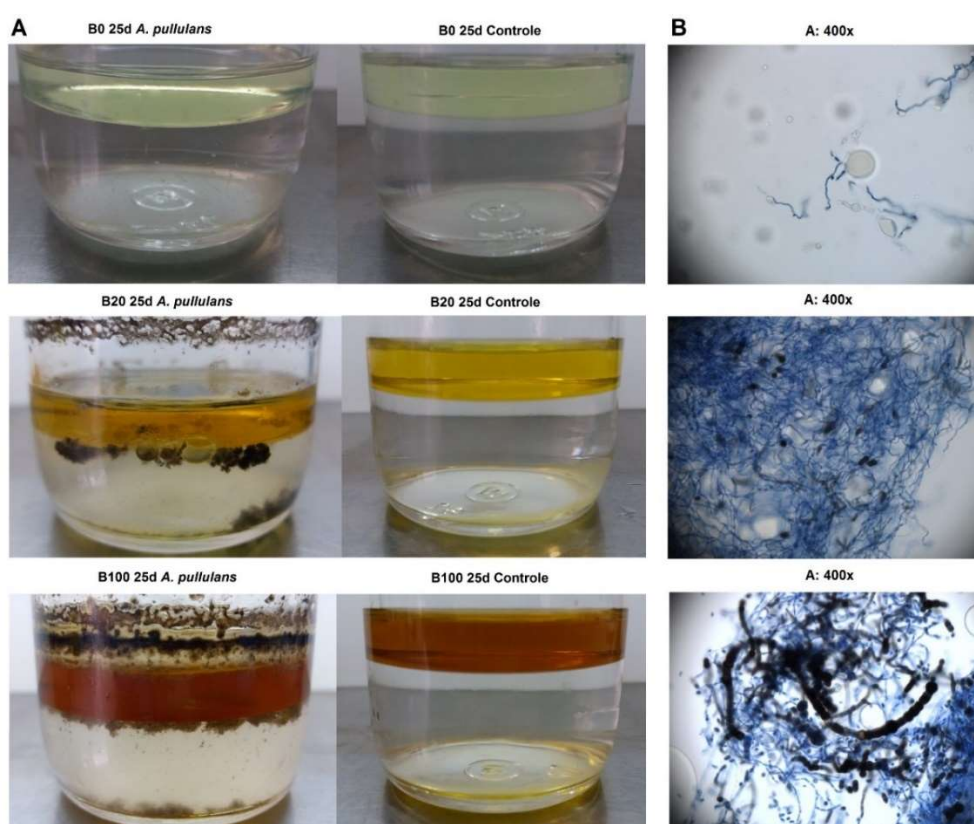


Figura 11 - (A) Aspecto visual dos frascos e do crescimento da levedura *A. pullulans* em B100, B0 e B20 após 25 dias de incubação; (B) visualização da biomassa formada por microscopia óptica, corada com azul de lactofenol (A: 400x).

O fungo *A. pullulans* foi capaz de crescer em biodiesel e na mistura B20, porém não foi observado o crescimento visual nos frascos, tampouco a formação de biomassa em diesel puro de petróleo (B0). O aspecto dos frascos e do crescimento leveduriforme está apresentado na Figura 12. As biomassas recuperadas dos frascos ao final do experimento corroboram essa constatação, sendo $74,2 \pm 13,5$ mg e $12,3 \pm 3,7$ mg encontrados em B100 e B20, respectivamente, enquanto o valor encontrado

para o diesel foi de $4,1 \pm 0,5$ mg.

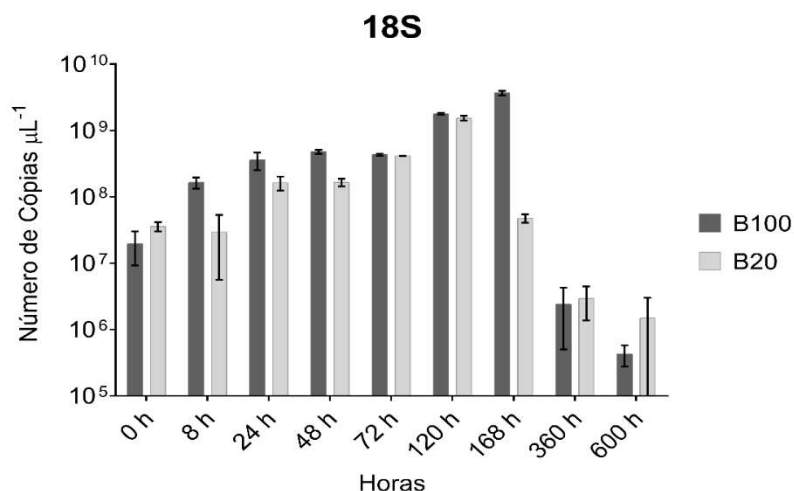


Figura 12 - Crescimento microbiano em biodiesel puro (B100) e na mistura B20, avaliado pela técnica de qPCR.

Boelter et al. (2018) avaliaram o crescimento do fungo filamentosso *Pseudallescheria boydii* em biodiesel, em diesel e na mistura B10. Os autores observaram que as maiores biomassas produzidas pelo fungo em questão eram encontradas nos tratamentos nos quais o biodiesel estava presente. Em outro experimento, o crescimento do fungo *Paecilomyces variotii* foi avaliado em biodiesel puro, em diesel puro e na mistura B7, sendo, em geral, as biomassas recuperadas maiores em amostras contendo biodiesel (Gassen et al., 2015).

Por não haver apresentado biomassa nem crescimento visual na presença de diesel puro (B0), o crescimento microbiano foi quantificado utilizando a técnica de qPCR apenas para os tratamentos com B100 e B20. Por meio dessa técnica foi possível acompanhar o crescimento da levedura *A. pullulans* nas diferentes fontes de carbono durante os tempos amostrais determinados e observar alterações marcantes no seu comportamento com relação à fase oleosa utilizada. De acordo com a Figura 12, os valores de cópias do gene 18S encontrados evidenciam uma preferência do isolado pelo biodiesel puro (B100). Nesse tratamento, valores de 10^9 número de cópias μL^{-1} foram observados aos cinco dias de crescimento, permanecendo nessa ordem de grandeza até os sete dias, tendo decaído para 10^6 número de cópias μL^{-1} após 15 dias de incubação.

Para o tratamento cuja fonte oleosa era composta pela mistura (B20) os valores de crescimento não diferiram dos mesmos dados do B100 até os cinco dias

(120h) ($P > 0,05$). Aos sete dias (168h), porém, para essa fonte de carbono, o número de cópias do gene 18S decresceu para 10^7 número de cópias μL^{-1} , mantendo-se esse decréscimo até o final do experimento. Esses resultados são indicativos de morte celular no tratamento B20 entre cinco a sete dias de incubação. Quando avaliamos o crescimento em ésteres de ácidos graxos puros (B100), entretanto, esse comportamento é apenas detectado a partir de sete dias.

Bücker et al. (2018) avaliaram o crescimento microbiano de um inóculo não caracterizado em diesel e biodiesel puro e nas misturas B5, B10 e B50 por qPCR, monitorando os genes 16S rDNA (bactérias), 18S rDNA (fungos) e *alkB* (responsável pelo metabolismo microbiano de alcanos, presentes em combustíveis). As cópias dos genes 18S rDNA (para fungos) detectadas foram de 10^9 – 10^{12} cópias por miligrama de biomassa em todos os tratamentos. A concentração de bactérias, bem como o crescimento monitorado pelo número de cópias do gene *alkB* apresentaram magnitudes 10^3 – 10^4 número de cópias mg^{-1} . Neste estudo foi possível acompanhar o crescimento da levedura *A. pullulans* de 10^7 número de cópias μL^{-1} até a magnitude de 10^9 número de cópias μL^{-1} em biodiesel puro e na mistura B20.

A técnica de qPCR também foi utilizada para elucidar processos de degradação de combustíveis e possíveis mudanças na comunidade microbiana. Cyplik et al. (2011) observaram que a presença de biodiesel nas amostras de combustível não afetou a estrutura da comunidade microbiana presente em um inóculo composto por sete bactérias. No entanto, a presença desse biocombustível teria influência nas diferentes taxas de degradação.

Bücker et al. (2018) detectaram resultados similares com um inóculo não caracterizado em diesel, biodiesel e misturas. Ao contrário do observado por esses autores, com os dados apresentados pela levedura *A. pullulans*, uma preferência dessa cepa em utilizar o carbono imobilizado nos ésteres de ácidos graxos como precursores para o seu crescimento foi observado.

5.5.5.2 pH

Os valores de pH detectados ao final de 25 dias de crescimento estão expressos na Tabela 2. Os resultados observados atestam o crescimento da levedura nas fontes de carbono contendo ésteres de ácidos graxos (B100 e B20). Valores de

pH de $5,6 \pm 0,12$ e $5,7 \pm 0,09$ foram observados nas fases aquosas referentes ao tratamento B100 e B20, respectivamente. Para o tratamento com diesel os valores foram similares aos dos controles $6,9 \pm 0,02$ e $6,9 \pm 0,06$ (controles $6,8 \pm 0,02$ e $6,9 \pm 0,02$).

Durante o metabolismo microbiano de hidrocarbonetos e ésteres de ácidos graxos constituintes do biodiesel, alguns produtos podem ser detectados na fase aquosa, resultado do consumo do carbono contido no combustível, entre eles ácidos orgânicos, aldeídos e acetonas (Bento et al., 2005; Azambuja et al., 2017). Ching et al. (2016) observaram o crescimento de outra levedura negra (*black yeast*), a *Moniliella wahieum* (cepa Y12), em biodiesel e notaram também uma diminuição no pH da fase aquosa, de 7,0 para 5,3, em 30 dias de crescimento no tratamento no qual a levedura estava presente. Em outro experimento com biodiesel e óleo de fritura como fonte de carbono, Leuchtler et al. (2017) detectaram a redução do pH do meio mineral para 78% dos isolados, sendo que os 6 microrganismos cujos pH mais decresceram eram eucariotos. Por exemplo, o fungo *Ustilago maydis* foi capaz de reduzir o pH inicial de 6,8 para 2,3 durante o tempo de incubação (de duas a três semanas).

A redução do pH nos sistemas de estocagem representa um desafio pois os ácidos produzidos podem influenciar os processos de corrosão e deterioração do próprio tanque de estocagem, levando a prejuízos econômicos e passivos ambientais (Allsopp et al., 2016; Leuchtler et al., 2017). Os resultados observados para a levedura *A. pullulans* a classificam como de grande importância no sistema de armazenamento, pois já é vista a capacidade dela de formar biofilme por meio de produção de biomassa (Figura 12), cápsula (Figura 8) e grandes quantidades de ácidos orgânicos, capazes de, em 25 dias, alterar o pH da fase aquosa em quase 20%, independentemente da fonte de carbono utilizada (Tabela 2).

Nos experimentos em microcosmos, normalmente são utilizados meios minerais, visando atender as relações de nitrogênio, fósforo e potássio para a célula microbiana. A adição de sais ao meio (fonte de nitrogênio, fosfato, potássio, sódio, etc.) atende à necessidade nutricional dos microrganismos e, ao mesmo tempo, alguns desses compostos podem atuar como tamponantes, como os fosfatos, por exemplo. Neste sentido, para ocorrer a redução significativa de medidas de pH, é preciso que ocorra uma grande produção de ácidos (orgânicos e/ou inorgânicos) pelos

microrganismos. Normalmente, os estudos de degradação de hidrocarbonetos utilizam como fase aquosa o meio mineral Bushnell e Haas (1941) para avaliar o crescimento de microrganismos, sendo que este meio apresenta em torno de 2 g de fosfato por litro.

5.5.5.3 SPME/GCMS

Com as técnicas de micro extração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa foi possível observar compostos voláteis presentes na fase aquosa, oriundos da migração dos componentes da fase oleosa. Além disso, indicativos de metabolismo microbiano foram observados. Esses resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Compostos detectados por GCMS na fase aquosa após 25 dias de incubação de *A. pullulans* em meio aquoso com biodiesel puro e mistura B20.

	B20	B100
Controle	Phenol, 2,4-di-tert-butyl-; Pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl, isobutyl ester; Salicylic acid, 2-ethylhexyl ester; Myristic acid, methyl ester	Phenol, 2,4-di-tert-butyl-; 2,6-Di-tert-butyl-4-sec-butylphenol; Pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl, isobutyl ester; Salicylic acid, 2-ethylhexyl ester; Salicylic acid, 3,3,5-trimethylcyclohexyl ester; Myristic acid, methyl ester; Nonanoic acid, 9-oxo-, methyl ester; Methyl myristoleate; Methyl palmitoleate; Linoleic acid, methyl ester
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Phenol, 2,4-di-tert-butyl-; 2,6-Di-tert-butyl-4-sec-butylphenol; Pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl, isobutyl ester; Myristic acid, methyl ester; Palmitaldehyde.	Phenol, 2,4-di-tert-butyl-; 2,6-Di-tert-butyl-4-sec-butylphenol; Pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl, isobutyl ester; Myristic acid, methyl ester; Methyl elaidate; Palmitaldehyde.

Segundo as análises realizadas foram constatados, após 25 dias de incubação, os mesmos compostos em todos os tratamentos, com e sem a presença da levedura *A. pullulans*. Tratam-se de substâncias presentes em antioxidantes e provenientes do próprio biodiesel e de sua matéria prima, a soja (Lam & Liese, 1990; Alghamdi et al., 2018). No tratamento com a presença da levedura, no entanto, foi observada a presença do composto palmitaldeído que, conforme a literatura, trata-se

de um metabólito (Sims et al., 2004; Singh & Poeta, 2016).

Regúlez et al. (1980) postularam que esse composto seria proveniente do crescimento do microrganismo denominado de *Pullularia pullulans*. Ainda segundo os autores, o composto seria produzido mais especificamente durante a transição das células leveduriformes para clamidósporos, células típicas produtoras de melanina pelo isolado.

Em outros organismos, o palmitaldeído desempenha um papel relacionado ao metabolismo de esfingolípídeos, os quais fazem parte da membrana plasmática das células leveduriformes. Sendo assim, durante a reciclagem desses lipídeos, o palmitaldeído seria considerado um metabólito intermediário, sendo gerado em um dos últimos passos de degradação desses lipídeos de membrana (Singh & Poeta, 2016). Os resultados observados por SPME reforçam a ideia do crescimento e metabolismo ativo do fungo *A. pullulans* com combustíveis como fonte de carbono durante o tempo e nas condições avaliadas.

5.5.5.4 Escala Haze

Não foi observada turbidez significativa referente ao crescimento de *A. pullulans* durante 25 dias em nenhum dos tratamentos. No entanto, o escurecimento do biodiesel foi observado no tratamento B100 aos 25 dias de experimento (Figura 13).

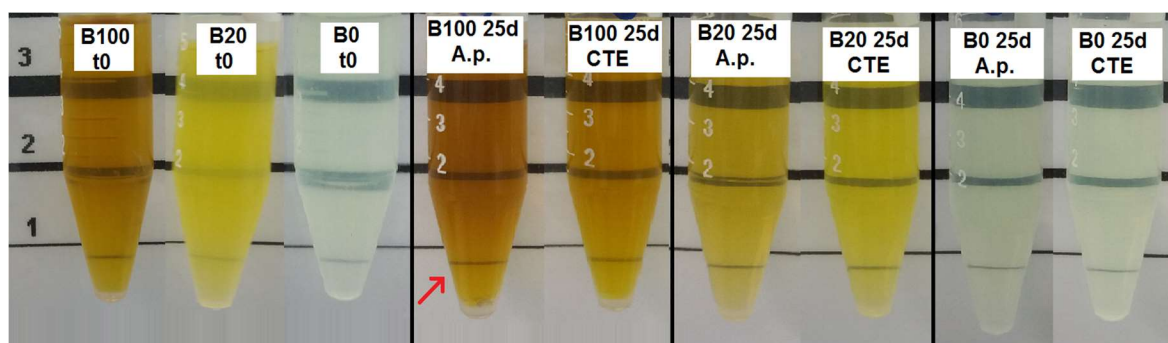


Figura 13 - Escala Haze de acordo com a norma ASTM D4176. Amostra que apresentou leve escurecimento indicada pela flecha vermelha. (A.p. – tratamento contendo inóculo fúngico; CTE – tratamento controle estéril).

Durante o crescimento da levedura *A. Pullulans*, na presença de certas fontes de carbono, a parede celular aumenta, podendo o tamanho desta atingir 500-

1200 nm. Além disso, muitos melanossomas são vistos no interior das células. Em clamidósporos jovens os melanossomas estão presentes apenas na parede celular e localizados principalmente próximos à camada interna. Porém, com o envelhecimento celular, a localização desses torna-se mais internalizada e bastante mais numerosa (Gniewosz & Duszkiewicz-Reinhard, 2008).

O escurecimento observado na amostra B100 (Figura 13) pode ter origem na formação de melanina pelo isolado ao longo do crescimento em biodiesel. Além disso, mortes celulares seguidas por lises após 7 dias de incubação, demonstradas pela Figura 14, poderiam liberar a melanina intracelular para o meio de cultura em questão.

Mudanças na turbidez do biodiesel podem ser causadas pela presença de água. O biodiesel é altamente higroscópico, sendo assim, durante o armazenamento deste há uma tendência na absorção de água, o que pode modificar a Escala Haze (D4176) (Fregolente et al., 2012). Altas temperaturas também podem acelerar a absorção de água pelos ésteres de ácidos graxos, facilitando, assim, o surgimento de crescimento microbiano, o qual beneficia-se da presença de umidade (Fregolente et al., 2012; Passman, 2013; Zimmer et al., 2017). No entanto, em nosso experimento, a turbidez dos combustíveis avaliados não apresentou alterações durante o processo de avaliação nas condições propostas.

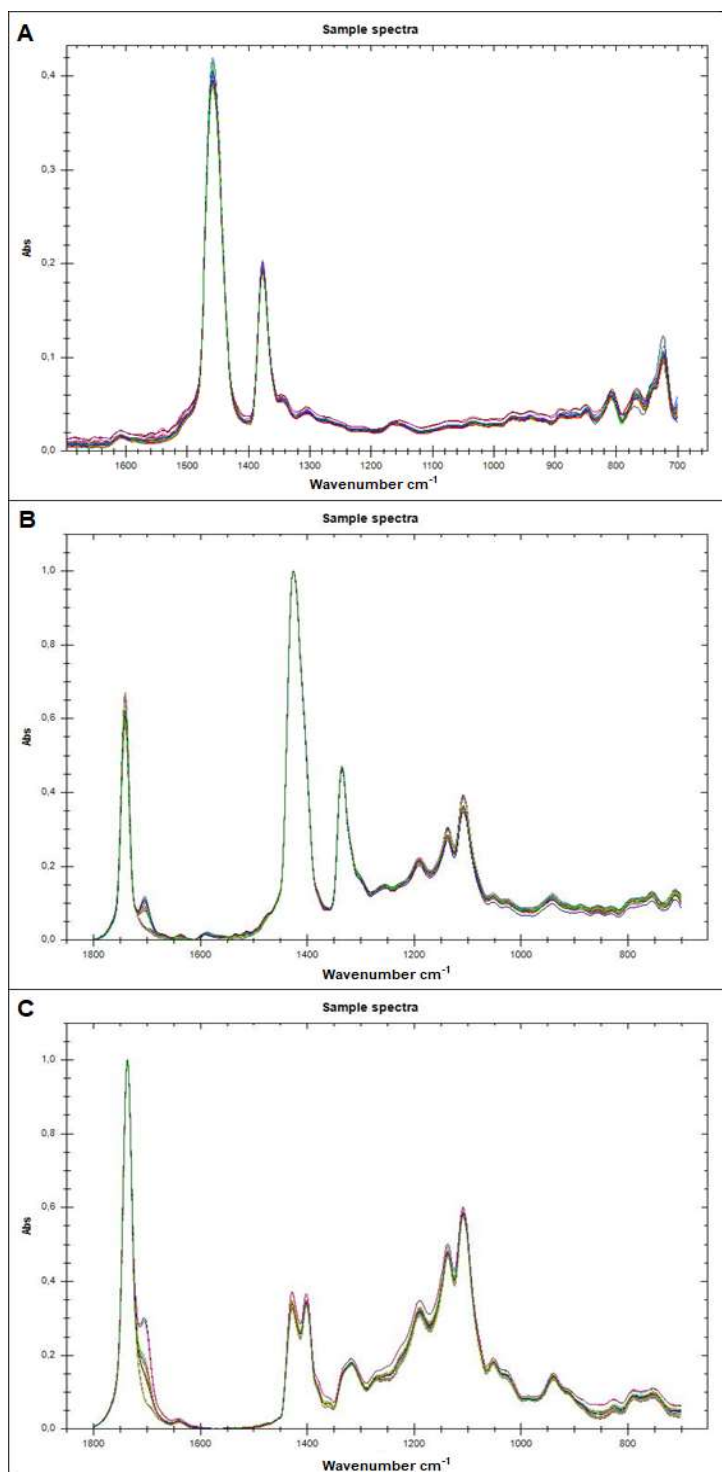


Figura 14 - Espectro de Infravermelho das amostras de (A) diesel puro (B0), (B) mistura B20, (C) biodiesel puro (B100).

5.5.5.1 Infravermelho e RMN

O conjunto de espectros gerado para todos os tratamentos com a técnica de infravermelho referente às amostras de B0, B20 e B100 do experimento é mostrado

nas Figuras 14. Os resultados indicam que nas amostras de B0 não houve modificações quando comparadas aos controles e tempos iniciais, o que está de acordo com os dados de crescimento e com a inabilidade da cepa de *A. pullulans* em utilizar o diesel puro como fonte de carbono nas condições avaliadas. No entanto, para as amostras de B20 e B100, tratamentos estes que apresentaram biomassa resultante do crescimento da levedura, podemos observar alterações nas cadeias carbônicas da fase oleosa. De acordo com o gráfico de pesos da primeira componente, a principal diferença entre as amostras foi na região da banda da carbonila ($1800-1600\text{ cm}^{-1}$), presente no biodiesel.

Os dados espectrais de todos os tratamentos foram avaliados pela perspectiva da análise de componentes principais (PCA) e por agrupamento hierárquico (HCA). Os resultados observados na Figura 15 para o diesel puro (B0) indicam que, com duas componentes principais (PCA), foi possível explicar 75,66% da variância dos dados. De acordo com os dados apresentados pela PCA e pelo agrupamento hierárquico (HCA), não foi possível observar alteração representativa da composição das cadeias carbônicas presentes nas amostras com o tratamento B0.

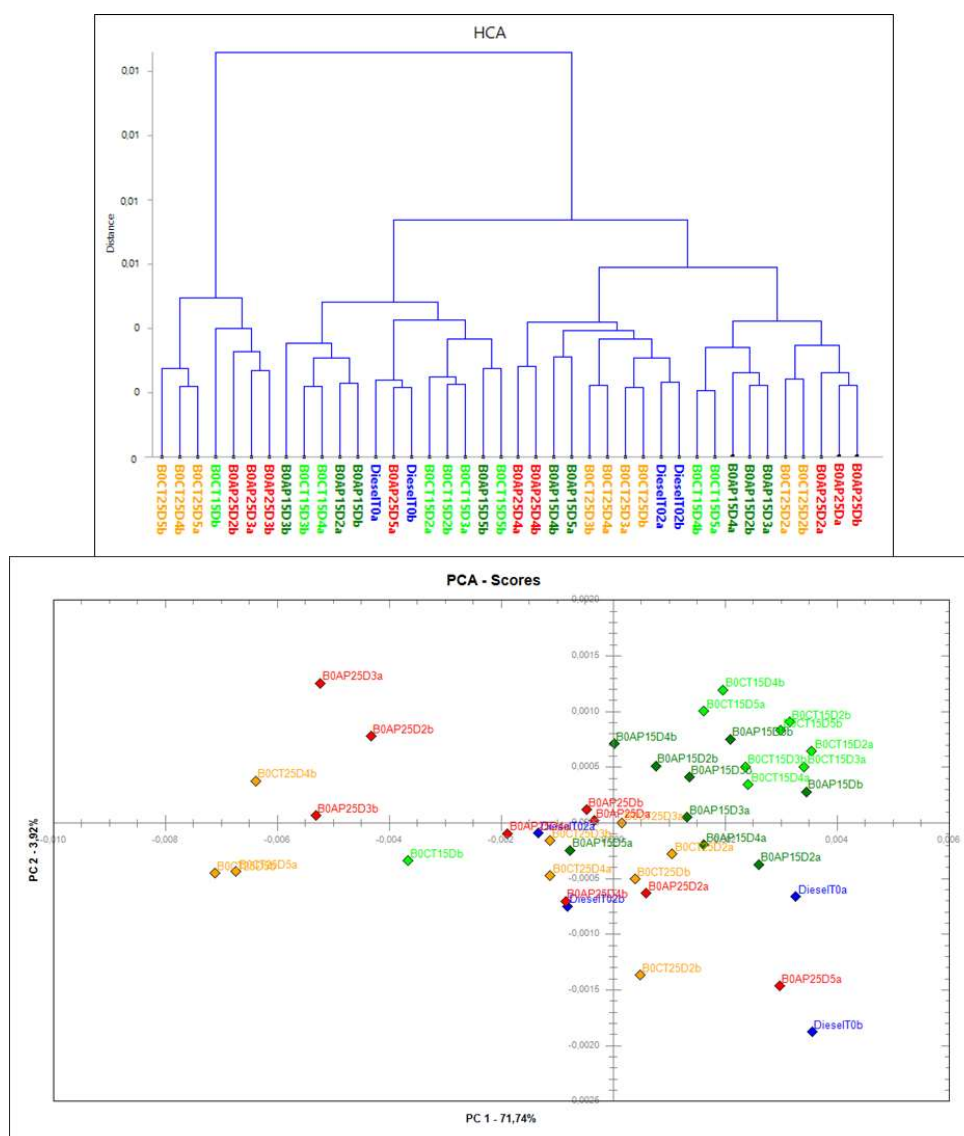


Figura 15 - Análise de componentes principais e grupamento hierárquico das amostras de diesel puro (B0).

Os resultados observados na Figura 16 para o diesel com 20% de biodiesel (B20) indicam que 91% da variância dos dados puderam ser explicados pelas duas primeiras componentes principais (PCA). Os resultados observados em ambas análises de PCA e HCA indicam que as amostras se separaram em dois grandes grupos. A partir da PC1 podemos concluir que o grupamento contendo a levedura evidencia modificações em sua estrutura quando comparado às amostras do tempo inicial e aos tratamentos controle. Tal dado é indicativo de que o crescimento microbiano causou deterioração do combustível durante o experimento, porém diferenças temporais, entre os 15 dias e os 25 dias de incubação, não puderam ser claramente demonstradas pela técnica de infravermelho.

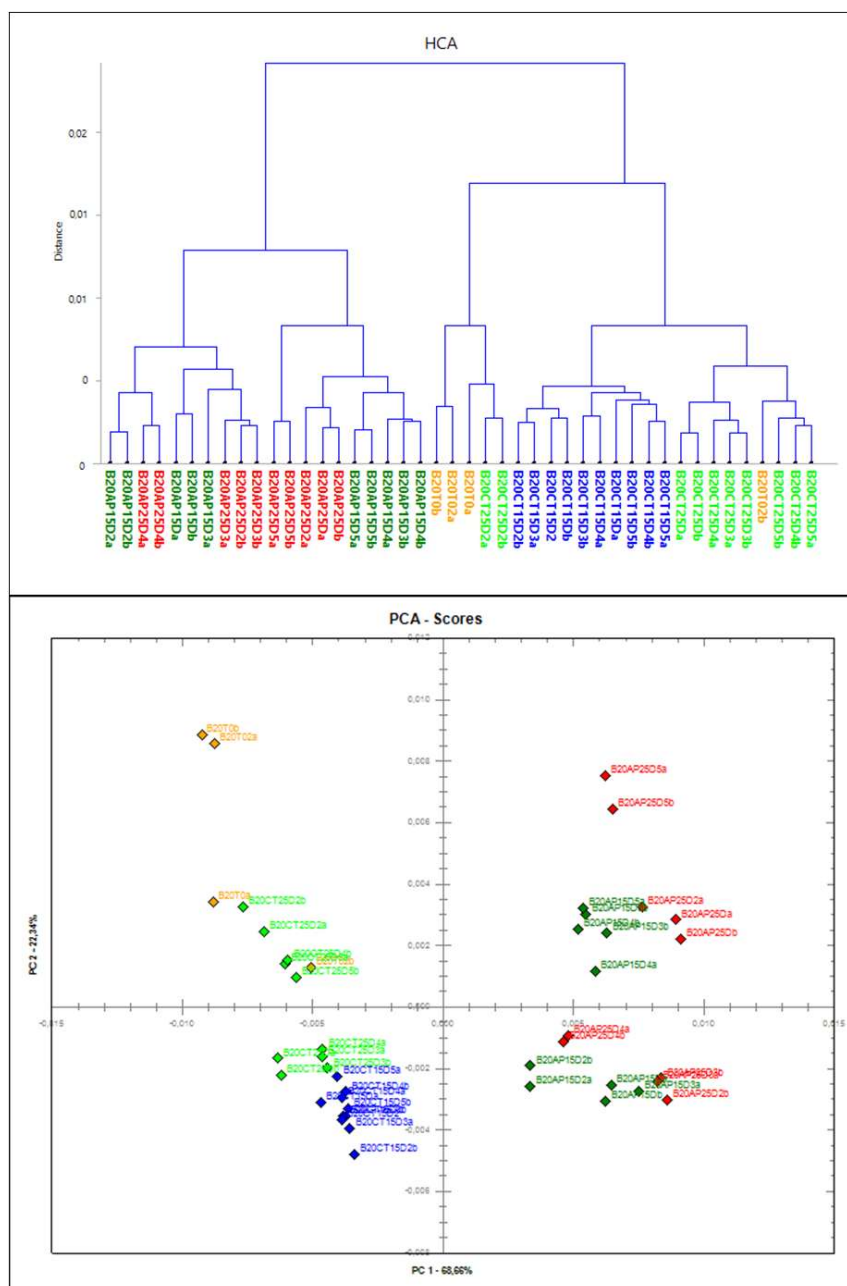


Figura 16 - Análise de componentes principais e agrupamento hierárquico das amostras de diesel com adição de 20% de biodiesel (B20).

O gráfico da PCA gerado para os dados de B100 explicam 97,95% da variabilidade das amostras, também com duas componentes principais (Figura 17). Entretanto, não houve diferenças evidenciadas no tratamento B20 quanto ao tempo do experimento. Os resultados observados na PCA para o biodiesel puro (B100) sugerem que, a partir da perspectiva da PC1, as amostras B100 t0 (tempo inicial), ou seja, a forma como o Biodiesel se apresentava anteriormente ao experimento, agruparam-se com os grupos controle de ambos os tempos avaliados e separaram-

se dos demais grupos contaminados.

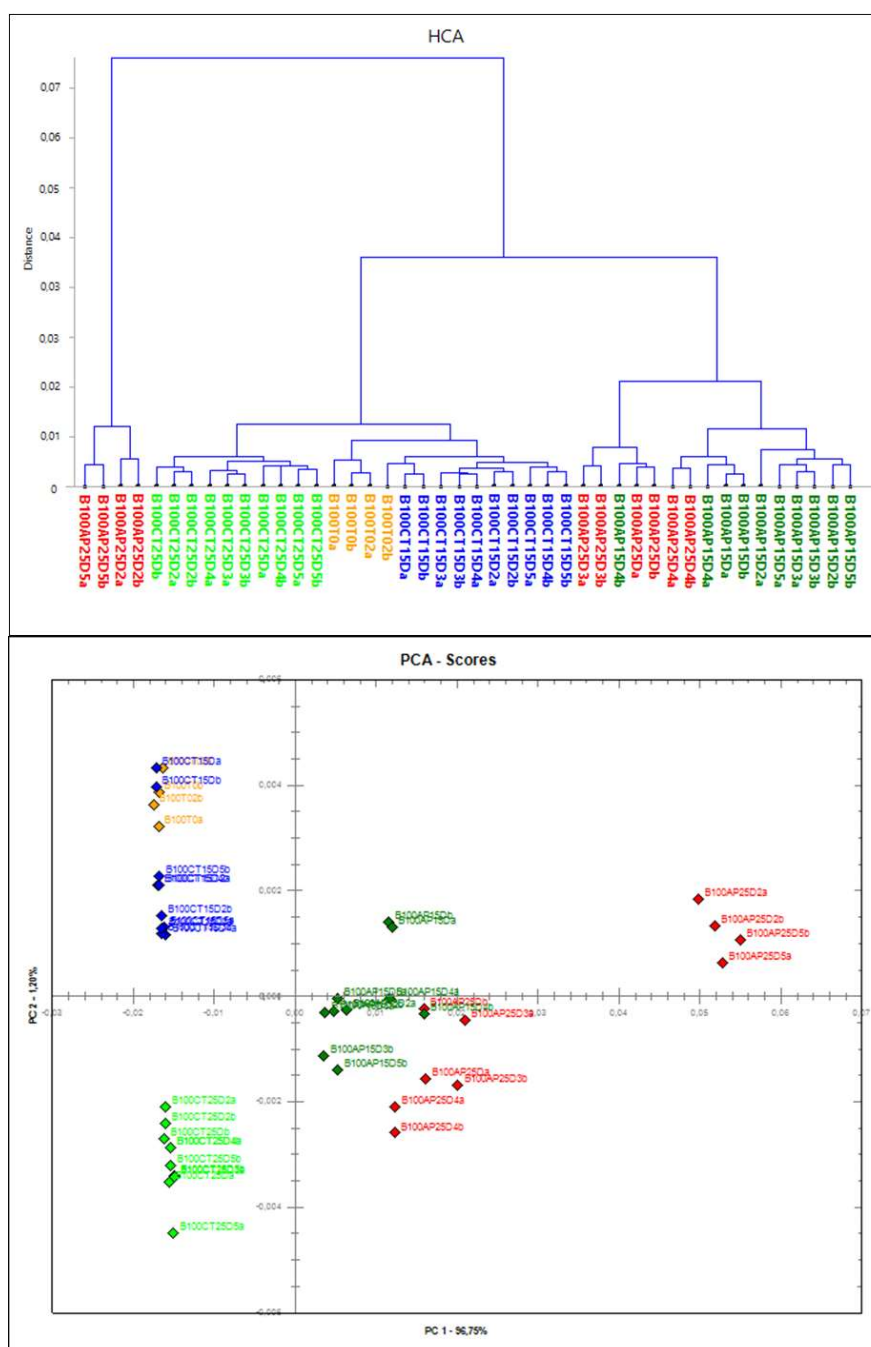


Figura 17 - Análise de componentes principais e agrupamento hierárquico das amostras de Biodiesel puro (B100).

Os grupos contaminados, por sua vez, separaram-se quanto ao tempo avaliado (15 e 25 dias), o que sugere que após 15 de armazenamento simulado a estrutura de cadeias carbônicas presentes no biodiesel se modificou devido ao crescimento da levedura *A. pullulans*. Além disso, a ação deteriorígenica não somente

persistiu como aumentou até o final do experimento (25 dias), evidenciando a capacidade da levedura alvo deste estudo de crescer e utilizar o carbono presente nos ésteres de ácidos graxos do biodiesel como fonte de carbono.

A partir dos dados de Infravermelho foi selecionado a fase oleosa B100 para análise por RMN. A fase oleosa na forma inicial está indicada na Figura 18. A partir dessa figura podemos observar as várias frações de hidrogênios presentes nas diferentes cadeias dos ésteres constituintes do biodiesel, caracterizados pela técnica de RMN. Entre eles os hidrogênios do grupo B, os quais estão presentes em todos os constituintes do biodiesel por fazerem parte do grupo metil ligado ao grupo éster, resultante da transesterificação com o álcool de cadeia curta metanol.

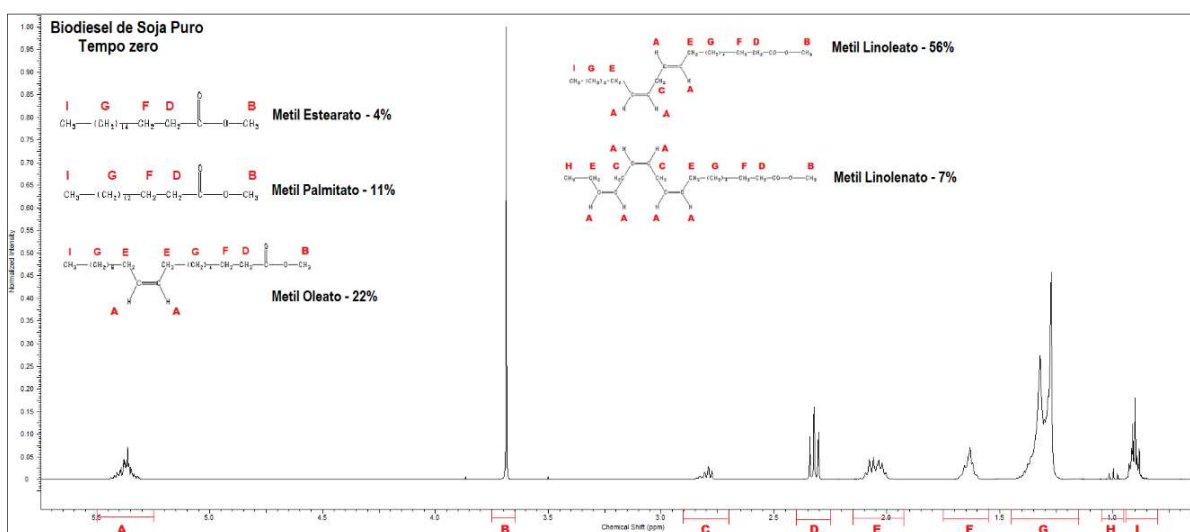


Figura 18 - Espectro de RMN da amostra de biodiesel de soja puro em sua forma inicial. Cada sinal está indicado por uma letra e a região a qual ele representa é indicada nos ésteres mais abundantes da amostra.

Após 25 dias de incubação com a presença do fungo *A. pullulans*, uma redução de 10% na presença dos hidrogênios do grupo B foi observada, o que sugere que essa foi a principal parte das moléculas utilizada como fonte de carbono (as metilas do grupo éster ligadas ao oxigênio com ligações simples) pelo microrganismo. Quando observamos o outro lado da cadeia, a parte apolar das moléculas, uma modificação no grupo de hidrogênios do tipo H é observada. Sendo que esses estão presentes apenas no éster linolênico (Metil Linolenato) (o mais insaturado) e cerca de 10% deles estão sendo usados como fonte de carbono, o que nos indica serem essas as segundas preferências do microrganismo estudado.

A biodeterioração de combustíveis por fungos vem sendo bem explorada pela literatura (Bücker et al., 2011; Cazarolli et al., 2016; Boelter et al., 2018). Ye et al. (2017) avaliaram o crescimento de dois fungos (*Moniliella wahieum* e *Byssochlamys nivea*), isolados de água contaminada com a mistura B20, nas misturas de diesel e biodiesel B5 e B20 e observaram que a ação do metabolismo dos fungos aumentou a degradação da fração diesel das misturas. Além disso, foi descrita uma preferência por biodiesel puro pelo fungo *Moniliella wahieum*, quando isolado. O mesmo pôde ser observado para o microrganismo *A. pullulans* LABBIO17, o qual não apresentou crescimento na presença de diesel e, quando na presença da mistura, produziu menor biomassa do que quando em biodiesel puro (tratamento B100). Os dados apresentados neste trabalho indicam ser, esse fungo, capaz de crescer e degradar preferencialmente ésteres de ácidos graxos e, como consequência, de assimilar o carbono contido nessas estruturas ao seu metabolismo celular.

5.6 CONCLUSÕES

Aureobasidium pullulans mostrou capacidade deteriorogênica em biodiesel e na mistura B20, observada pela produção de biomassa e respectiva curva de crescimento determinada por qPCR, sendo detectada, por infravermelho e RMN, uma preferência por ésteres de ácidos graxos, constituintes do biodiesel, no metabolismo do microrganismo. Foi constatada a produção da enzima lipase e o acúmulo de lipídeos, bem como a formação de biofilme com a presença de clamidósporos na presença de biodiesel.

5.7 AGRADECIMENTOS

Ao LAB-BIO/UFRGS, ao Instituto de Química da UFRGS, ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas e à Usina de Biodiesel 3 Tentos.

5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira de Normas Técnicas (2014). NBR 15512: Biodiesel —

- Armazenamento, transporte, abastecimento e controle de qualidade de biodiesel e/ou óleo diesel BX. Rio de Janeiro.
- Alghamdi, S., Migdadi, H., Khan, M., El-Harty, E. H., Ammar, M., Farooq, M. et al. (2018). Phytochemical Profiling of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Genotypes Using GC-MS Analysis. In ASAO, T. (Ed.), *Phytochemicals-Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*. London: Intech Open.
- Allsopp, D., Seal, K., Gaylarde, C., Bento, F. M., Shirakawa, M., & Saad, D. S. (2016) *Introdução à biodeterioração*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- American Society for Testing and Materials. (2004). *ASTM D4176-04: Standard Test Method for Free Water and Particulate Contamination in Distillate Fuels (Visual Inspection Procedures)*. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- Andrews, J. H., Harris, R. F., Spear, R. N., Lau, G. W., & Nordheim, E. V. (1994). Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(1), 6-17.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2014). *Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica: Módulo VII*. Brasília, DF: ANVISA.
- Bamadhaj, H. M., Chan, G. F., & Rashid, N. A. A. (2015). Chapter 14 *Aureobasidium*. In Paterson, R. R. M., & Lima N. (Eds.). (2015). *Molecular Biology of Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi*. CRC Press.
- Beker, S. A., da Silva, Y. P., Bücker, F., Cazarolli, J. C., de Quadros, P. D., Peralba, M. D. C. R. et al. (2016). Effect of different concentrations of tert-butylhydroquinone (TBHQ) on microbial growth and chemical stability of soybean biodiesel during simulated storage. *Fuel*, 184, 701-707.
- Benjamin, S., & Pandey, A. (2000). Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43(5), 453-460.
- Bento, F. M. (2001). *Biocorrosão do aço ASTM A283-93 em sistemas diesel água e o efeito de um biocida*. Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia Metalúrgica e dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Bento, F. M., Beech, I. B., Gaylarde, C. C., Englert, G. E., & Muller, I. L. (2005). Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system.

- World J. Microbiol. Biotechnol*, 21(2), 135-142.
- Bento, F. M., Peralba, M. C. R., Ferrão, M. F., Zimmer, A. R., Azambuja, A. O., Barbosa, C. S. et al. (2016). Diagnóstico, Monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento. In Pinho, D. M. M., & Suarez, P. A. Z. (Orgs.), *Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle*. (1a. ed.). Brasília: CDT, UNB.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Boelter, G., Cazarolli, J. C., Beker, S. A., de Quadros, P. D., Correa, C., Ferrão, M. F. et al. (2018). Pseudallescheria boydii and Meyerozyma guilliermondii: behavior of deteriorogenic fungi during simulated storage of diesel, biodiesel, and B10 blend in Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(30), 30410-30424.
- Bornscheuer, U. T. (2018). Enzymes in Lipid Modification. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 85-103.
- Botić, T., Kralj-Kunčič, M., Sepčić, K., Batista, U., Zalar, P., Knez, Ž. Et al. (2014). Biological activities of organic extracts of four Aureobasidium pullulans varieties isolated from extreme marine and terrestrial habitats. *Natural product research*, 28(12), 874-882.
- Bozoudi, D., & Tsaltas, D. (2018). The Multiple and Versatile Roles of Aureobasidium pullulans in the Vitivinicultural Sector. *Fermentation*, 4(4), 85.
- Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005*. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. Recuperado de http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm
- Lei n. 13.576, de 26 de dezembro de 2017*. Dispõe sobre a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) e dá outras providências. Recuperado de http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/L13576.htm
- Bücker, F., Barbosa, C. S., Quadros, P. D., Bueno, M. K., Fiori, P., te Huang, C. et al. (2014). Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 346-355.
- Bücker, F., de Moura, T. M., da Cunha, M. E., de Quadros, P. D., Beker, S. A.,

- Cazarolli, J. C. et al. (2018). Evaluation of the deteriorogenic microbial community using qPCR, n-alkanes and FAMES biodegradation in diesel, biodiesel and blends (B5, B10, and B50) during storage. *Fuel*, 233, 911-917.
- Bücker, F., Santestevan, N. A., Roesch, L. F., Jacques, R. J. S., Peralba, M. C. R., Camargo, F. A. O. et al. (2011). Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 65, 172–178.
- Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The utilization of hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.*, 41, 653-673.
- Bussamara, R., Fuentesfria, A. M., de Oliveira, E. S., Broetto, L., Simcikova, M., Valente, P. et al. (2010). Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*, 101(1), 268-275.
- Cazarolli, J. C., Boelter, G., de Lima, A. M., Hengles, T., Correa, C., Peralba, M. C. et al. (2018). Nature of insoluble material found in the bottom of soybean biodiesel storage tank: chemical and microbiological approach. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(10), 2034-2045.
- Cazarolli, J. C., de Quadros, P. D., Bücker, F., Santiago, M. R. F., Piatnicki, C. M. S., Peralba, M. D. et al. (2016). Microbial growth in *Acrocomia aculeata* pulp oil, *Jatropha curcas* oil, and their respective biodiesels under simulated storage conditions. *Biofuel Research Journal*, 3(4), 514-520.
- Cazarolli, J. C., Guzatto, R., Samios, D., Peralba, M. D. C. R., Cavalcanti, E. H. D. S., & Bento, F. M. (2014). Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 95, 364-372.
- Chan, G. F., Bamadhaj, H. M., Gan, H. M. & Rashid, N. A. A. (2012). Genome sequence of *Aureobasidium pullulans* AY4, an emerging opportunistic fungal pathogen with diverse biotechnological potential. *Eukaryot Cell*, 11(11), 1419-1420.
- Ching, T. H., Yoza, B. A., Wang, R., Masutani, S., Donachie, S., Hihara, L. et al. (2016). Biodegradation of biodiesel and microbiologically induced corrosion of 1018 steel by *Moniliella wahieum* Y12. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 122-126.
- Cyplik, P., Schmidt, M., Szulc, A., Marecik, R., Lisiecki, P., Heipieper, H. J. et al.

- (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.
- Rosa, P. D., Mattanna, P., Carboni, D., Amorim, L., Richards, N., & Valente, P. (2014). *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia microbiologica*, 59(6), 477-484.
- Deshpande, M. S., Rale, V. B., & Lynch, J. M. (1992). *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(7), 514-527.
- Dhar, R., Sagesser, R., Weikert, C., Yuan, J., & Wagner, A. (2011). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to saline stress through laboratory evolution. *Journal of evolutionary biology*, 24(5), 1135-1153.
- Dodos, G. S., Konstantakos, T., Longinos, S., & Zannikos, F. (2012). Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. *Global NEST Journal*, 14(2), 175-182.
- Fregolente, P. B. L., Fregolente, L. V., & Maciel, M. R. W. (2012). Water content in biodiesel, diesel, and biodiesel–diesel blends. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 57(6), 1817-1821.
- Gassen, J., Bento, F. M., Frazzon, A. P. G., Ferrão, M. F., Marroni, I. V., & Simonetti, A. B. (2015). Growth of *Paecilomyces variotii* in B0 (diesel), B100 (biodiesel) and B7 (blend), degradation and molecular detection. *Brazilian Journal of Biology*, 75(3), 541-547.
- Gaylarde, C. C., Bento, F. M., & Kelley, J. (1999). Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Revista de microbiologia*, 30(1), 01-10.
- Gerstein, A. C., Chun, H. J. E., Grant, A., & Otto, S. P. (2006). Genomic convergence toward diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*, 2, 1396–1401.
- Goold, H., Beisson, F., Peltier, G., & Li-Beisson, Y. (2015). Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant cell reports*, 34(4), 545-555.
- Gostinčar, C., Ohm, R. A., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J. et al. (2014). Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC genomics*, 15(1), p. 549, 2014.
- Graeff, M. (2018). Lipid droplet-mediated lipid and protein homeostasis in budding

- yeast. *FEBS letters*, 592(8), 1291-1303.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotech. Adv.*, 27(6), 782-798.
- Hill, E. C., Hill, G. C. (2008). Microbial Contamination and Associated Corrosion in Fuels, During Storage, Distribution and Use. *Advanced Materials Research*, 38, 257-268.
- Itah, A. Y., Brooks, A. A., Ogar, B. O., & Okure, A. B. (2009). Biodegradation of international jet A-1 aviation fuel by microorganisms isolated from aircraft tank and joint hydrant storage systems. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 83(3), 318-327.
- Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 16(9), 396-403.
- Jakeria, M. R., Fazal, M. A., & Haseeb, A. S. M. A. (2014). Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 30, 154-163.
- Knothe, G., & Razon, L. F. (2017). Biodiesel fuels. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 58, 36-59.
- Lam, W. Y., & Liesen, G. P. (1990). U.S. Patent No. 4,946,610. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Leathers, T. D., Rich, J. O., Anderson, A. M., & Manitchotpisit, P. (2013). Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology letters*, 35(10), 1701-1706.
- Lee, J. S., Ray, R. I., & Little, B. J. (2010). An assessment of alternative diesel fuels: microbiological contamination and corrosion under storage conditions. *Biofouling*, 26(6), 623-635.
- Leuchtle, B., Epping, L., Xie, W., Eiden, S. J., Koch, W., Diarra, D. et al. (2018). Defined inoculum for the investigation of microbial contaminations of liquid fuels. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 132, 84-93.
- Lima, M. T. D. S. L., de Souza, M. C., Flores, T. S., Cruz, N. G. S., Diamantino, H. D., Barroso, L. A. et al. (2015). Sobre a Situação Energética Brasileira: De 1970 a 2030. *Ciência e Natura*, 37(2), 6-16.
- Liu, Y. Y., Chi, Z., Wang, Z. P., Liu, G. L., & Chi, Z. M. (2014). Heavy oils, principally

- long-chain n-alkanes secreted by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* strain P5 isolated from mangrove system. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41(9), 1329-1337.
- Liu, Z., Li, X., Chi, Z., Wang, L., Li, J., & Wang, X. (2008). Cloning, characterization and expression of the extracellular lipase gene from *Aureobasidium pullulans* HN2-3 isolated from sea saltern. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(2), 245-255.
- Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2011). Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? *FoodSci. Technol.*, 31(3), 603-613.
- Lutterbach, M. T. S., & Galvão, M. M. (2010). Fuel for the future: biodiesel—a case study. In Whitby, C., Skovhus, T. L. (Eds.). *Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems* (pp. 229-235). Dordrecht: Springer.
- Luz, G., Sousa, B., Guedes, A., Barreto, C., & Brasil, L. (2018). Biocides Used as Additives to Biodiesels and Their Risks to the Environment and Public Health: A Review. *Molecules*, 23(10), 2698.
- Manitchotpisit, P., Price, N. P., Leathers, T. D., & Punnapayak, H. (2011). Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology letters*, 33(6), 1151-1157.
- Martin-Sanchez, P. M., Becker, R., Gorbushina, A. A., & Toepel, J. (2018a). An improved test for the evaluation of hydrocarbon degradation capacities of diesel-contaminating microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 129, 89-94.
- Martin-Sanchez, P. M., Gorbushina, A. A., & Toepel, J. (2018b). Quantification of microbial load in diesel storage tanks using culture-and qPCR-based approaches. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 216-223.
- Mateos, J. C., Ruiz, K., Rodriguez, J. A., Cordova, J., & Baratti, J. Mapping substrate selectivity of lipases from thermophilic fungi. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 49(1-4), 104-112.
- Mattei, L. (2010). Programa nacional para produção e uso do biodiesel no Brasil (PNPB): trajetória, situação atual e desafios. *Revista Econômica do Nordeste*, 41(4), 731-740.
- McNamara, C. J., Perry IV, T. D., Leard, R., Bearce, K., Dante, J., & Mitchell, R. (2005). Corrosion of aluminum alloy 2024 by microorganisms isolated from aircraft fuel tanks. *Biofouling*, 21(5-6), 257-265.

- Meneghetti, S. P., Meneghetti, M. R., & Brito, Y. C. (2013). A Reação de Transesterificação, Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel. *Rev. Virt. Quím.*, 5(1), 63-73.
- Ministério de Minas e Energias. (2018). *Balanço Energético Nacional 2018: Relatório Síntese 2017*. Rio de Janeiro: EPE.
- Mojarad, M., Alemzadeh, A., Ghoreishi, G., & Javaheri, M. (2016). Kerosene biodegradation ability and characterization of bacteria isolated from oil-polluted soil and water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(4), 4323-4329.
- Pasqualino, J. C., Montané, D., & Salvadoó, J. (2006). Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass & Bioenergy*, 30, 874–879.
- Passman, F. J. (2013). Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980—a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 88-104.
- Passman, F., & Dobranick, J. K. (2005, September). Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. *Proceedings of the International Conference in Stability, Handling, and Use of Liquid Fuels*, Sitges, Spain, 9.
- Passman, F. J. (Ed.) (2003). *Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis, and Contamination Control*. ASTM.
- Pinho, D. M. M., Suarez, P. A. Z., Meneghetti, S. M. P., & Rangel, E. T. (2016). Problemas de formação de borras durante a estocagem verificados após a obrigatoriedade do biodiesel e as possíveis causas. In Pinho, D. M. M., & Suarez, P. A. Z. (Orgs.), *Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle*. (1a. ed.). Brasília: CDT, UNB.
- Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W., & Punnapayak, H. (2018). The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia microbiologica*, 63(2), 129-140.
- Pyc, M., Cai, Y., Greer, M. S., Yurchenko, O., Chapman, K. D., Dyer, J. M. et al. (2017). Turning over a new leaf in lipid droplet biology. *Trends in plant science*, 22(7), 596-609.
- Radwan, O., Gunasekera, T. S., & Ruiz, O. N. (2018). Robust Multiplex Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for Universal Detection of Microorganisms in Fuel. *Energy & Fuels*, 32(10), 10530-10539.
- Ramani, K., Saranya, P., Jain, S. C., & Sekaran, G. (2013). Lipase from marine strain using cooked sunflower oil waste: production optimization and application for

- hydrolysis and thermodynamic studies. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(3), 301-315.
- Rauch, M. E., Graef, H. W., Rozenzhak, S. M., Jones, S. E., Bleckmann, C. A., Kruger, R. L. et al. (2006). Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 29-36.
- Régulez, P., Ponton, J., Dominguez, J. B., Goñi, F. M., & Uruburu, F. (1980). Lipid composition and the transition from yeast-like to chlamydospore cells of *Pullularia pullulans*. *Canadian journal of microbiology*, 26(12), 1428-1437.
- Saadoun, I. (2002). Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 42(6), 420-428.
- Salama, Y., Chennaoui, M., Sylla, A., Mountadar, M., Rihani, M., & Assobhei, O. (2016). Characterization, structure, and function of extracellular polymeric substances (EPS) of microbial biofilm in biological wastewater treatment systems: a review. *Desalination and Water Treatment*, 57(35), 16220-16237.
- Saratale, G., Kalme, S., Bhosale, S., & Govindwar, S. (2007). Biodegradation of kerosene by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *Journal of basic microbiology*, 47(5), 400-405.
- Schauer, F., & Borriss, R. (2004). Biocatalysis and Biotransformation. In: Tkacz J.S., & Lange L. (Eds.) *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*. Boston (MA): Springer.
- Sharma, D., & Sharma, B., Shukla, A. K. (2011). Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnology*, 10(1), 23-40.
- Silva, V. O., Soares, L. O., Júnior, A. S., Mantovani, H. C., Chang, Y., & Moreira, M. A. S. (2014). Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis. *Applied and environmental microbiology*, 80(19).
- Sims, K. J., Spassieva, S. D., Voit, E. O., & Obeid, L. M. (2004). Yeast sphingolipid metabolism: clues and connections. *Biochemistry and cell biology*, 82(1), 45-61.
- Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(2), 486-520.

- Singh, A., & Poeta, M. D. (2016). Sphingolipidomics: an important mechanistic tool for studying fungal pathogens. *Frontiers in microbiology*, 7, 501.
- Singh, R., Gaur, R., Bansal, S., Biswas, P., Pandey, P. K., Jamal, F. et al. (2015). *Aureobasidium pullulans*-an industrially important pullulan producing black yeast. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4(10), 605-622.
- Singh, R.S., Kaur, N., Rana, V., & Kennedy, J. F. (2017). Pullulan: a novel molecule for biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 171, 102-121.
- Soriano, A. U., Martins, L. F., Ventura, E. S. A., de Landa, F. H. T. G., Valoni, E. A., Faria, F. R. D. et al. (2015). Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 99, 102-114.
- Tebbouche, L., Hank, D., Zeboudj, S., Namane, A., & Hellal, A. (2016). Evaluation of the phenol biodegradation by *Aspergillus niger*: application of full factorial design methodology. *Desalination and Water Treatment*, 57(13), 6124-6130.
- Van Bogaert, I. N., Groeneboer, S., Saerens, K., & Soetaert, W. (2011). The role of cytochrome P450 monooxygenases in microbial fatty acid metabolism. *The FEBS journal*, 278(2), 206-221.
- Vorapreeda, T., Thammarongtham, C., Cheevadhanarak, S., & Laoteng, K. (2015). Genome mining of fungal lipid-degrading enzymes for industrial applications. *Microbiology*, 161(8), 1613-1626.
- Wachowska, U., Głowacka, K., Mikołajczyk, W., & Kucharska, K. (2016). Biofilm of *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* on winter wheat kernels and its effect on other microorganisms. *Microbiology*, 85(5), 523-530.
- Wang, C. L., Li, Y., Xin, F. H., Liu, Y. Y., & Chi, Z. M. (2014). Single cell oil production by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* P10 isolated from mangrove systems for biodiesel making. *Proc. Biochem.*, 49, 725-731.
- Winkler, U. K., & Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, 138, 663-670.
- Xue, S. J., Chi, Z., Zhang, Y., Li, Y. F., Liu, G. L., Jiang, H. et al. (2018). Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications. *Critical reviews in biotechnology*, 38(7), 1049-1060.
- Ye, C., Ching, T. H., Yoza, B. A., Masutani, S., & Li, Q. X. (2017). Cometabolic degradation of blended biodiesel by *Moniliella wahieum* Y12 T and *Byssochlamys*

nivea M1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125, 166-169.

Zimmer, A. R., Oliboni, A., Viscardi, S. L., Teixeira, R. M., Ferrão, M. F., & Bento, F. M. (2017). Biodiesel blend (B10) treated with a multifunctional additive (biocide) under simulated stored conditions: a field and lab scale monitoring. *Biofuel Research Journal*, 4(2), 627-636.

Zimmer, A., Cazarolli, J., Teixeira, R. M., Viscardi, S. L. C., Cavalcanti, E. S. H., Gerbase, A. E. et al. (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.

6 PUBLICAÇÃO 3: IMPACTO DO TEOR DE ÁGUA PRESENTE NO BIODIESEL NO CRESCIMENTO E ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS DURANTE ESTOCAGEM SIMULADA

Juciana Clarice Cazarolli^a, Thais Livramento Silva^a, Mariane Rodrigues Lobato^a, Jhonata Rodrigues de Brito^a, João Victor de Souza Rocha^b, Aline Oliboni de Azambuja^a, Michelle Bertoni Mann^a, Marco Flores Ferrão^b, Maria do Carmo Ruaro Peralba^b, Márcia Martinelli^b, Ana Paula Frazzon^a, Jeverson Frazzon^a, Patrícia Door de Quadros^a, Flávio Anastácio Oliveira Camargo^a, Fátima Menezes Bento^a

^a Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis (LABBIO), Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, N° 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, N° 9500, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

6.1 HIGHLIGHTS

O fungo filamentoso *Penicillium simplicissimum* foi considerado deteriogênico de biodiesel pois produziu $12,6 \pm 0,52$ mg de biomassa com 200 ppm de água.

Teores de água superiores ao permitido em lei podem alterar propriedades químicas, físicas e microbiológicas do biodiesel durante o armazenamento do combustível.

A composição da comunidade fúngica foi afetada pelo teor de água presente no biodiesel, bem como pelo aporte de nutrientes durante o período de estocagem simulada.

6.2 RESUMO

Durante a estocagem, características físicas e químicas do biodiesel podem predispor a reações de degradação, mediadas ou não por microrganismos. O teor de água é considerado uma das propriedades expeditas para a liberação do biodiesel para o mercado e o principal fator para o crescimento microbiano. Um volume de biodiesel de soja comercial foi contaminado com teores de água ultrapura

diferentes e com a adição de meio mínimo mineral Bushnell e Haas (BH) como aporte mineral e comparativo. As avaliações seguiram por 30 dias e ao final avaliou-se o acúmulo de água total pelo biodiesel, a estabilidade à oxidação, a deterioração e o crescimento microbiano durante a estocagem simulada. As condições estabelecidas para os níveis de contaminação microbiana foram: contaminação como recebida (RE), com um fungo filamentoso (*Penicillium simplicissimum*) (PE) e com um inóculo não caracterizado preparado de acordo com a norma ASTM E1259 (ASTM). Diferenças na composição da comunidade microbiana sob a influência do teor de água foram avaliadas para a condição ASTM por sequenciamento de alto rendimento. Aos 30 dias maiores biomassas foram observadas recuperadas dos tratamentos com maiores teores de água e com aporte mineral. A condição ASTM apresentou comunidades microbianas distintas relacionadas ao tempo e aos teores de água, sendo que o meio BH foi responsável por selecionar os táxons presentes no inóculo inicial. O teor de água final aumentou de 470 a 900% e a estabilidade à oxidação diminuiu após 30 dias de incubação. Após esse período, foram observadas modificações nas estruturas carbônicas presentes no biodiesel causadas pela presença de água e microrganismos, indicando uma deterioração do produto nas condições avaliadas.

6.3 INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis têm sido a principal fonte energética mundial, representando 78% de todas as emissões de gases do efeito estufa no período de 1970 a 2011. Estratégias para reduzir as intensidades de geração de emissões de carbono dos combustíveis incluem o uso de eletricidade, hidrogênio e biocombustíveis (IPCC, 2014). O uso de biocombustíveis, como o biodiesel e o etanol, é proposto como uma alternativa aos combustíveis fósseis considerada menos impactante ao meio ambiente.

O Brasil consumiu 4.791 mil toneladas equivalentes de petróleo (tep) em 2017, ao passo que, no mesmo período, o país foi considerado o 2º maior produtor de combustíveis de fontes renováveis (MME, 2018; BP, 2018; REN21, 2018). Desde a aprovação da lei nº. 11.097, de 2005, o biodiesel vem fazendo parte da matriz energética brasileira devido à medida mandatória de adição de biodiesel ao diesel de petróleo. Atualmente, essa proporção é de 10% de biodiesel adicionado ao diesel

(B10) e a perspectiva no cenário nacional sinaliza para um aumento dessa porcentagem.

O biodiesel somente é liberado para o mercado após a realização de algumas análises especificadas pela Resolução ANP nº 45, de 2014. Dentre as análises exigidas estão: o teor de éster, a viscosidade cinemática a 40°C, a massa específica a 20 °C, o teor de água, o índice de acidez, a estabilidade à oxidação a 110 °C, etc. O teor de água, até a publicação da Resolução nº. 14 da ANP, de 11 de maio de 2012, era de 500 mg Kg⁻¹, determinada pelos métodos ASTM 6304 e EN ISO 12937. Posteriormente, o limite admitido até 60 dias após a publicação da Resolução era de 380 mg Kg⁻¹. A partir de 1º de janeiro de 2013 até 31 de dezembro de 2013 o limite máximo estabelecido foi de 350 mg Kg⁻¹ e desde 1º de janeiro de 2014 o limite máximo é de 200 mg Kg⁻¹ (ANP, 2012; ANP, 2014). Os valores de cada análise devem estar de acordo com os limites impostos pelas normas e são indispensáveis para que o biocombustível tenha o rendimento esperado no motor (Lôbo et al., 2009; Hoekman et al., 2012).

O biodiesel é produzido pela reação de transesterificação, na qual uma fonte de ácido graxo reage com um álcool, gerando ésteres de ácidos graxos e glicerol (Lôbo et al., 2009; Knothe & Razon, 2017). Uma das diferenças entre o biodiesel e o diesel é a sua resistência a processos oxidativos. O biodiesel, possui em sua composição duplas ligações entre os carbonos, presentes nos ésteres, as quais são suscetíveis a processos de autooxidação, o que diminui a estabilidade do combustível durante o armazenamento. Outro fator muito importante é o potencial em acumular água durante os processos de produção, transporte e estocagem, o que pode provocar naturalmente uma não conformidade desse teor com os limites impostos em lei (Lôbo et al., 2009; Knothe & Razon, 2017).

O biodiesel é considerado mais higroscópico que o diesel devido à presença de átomos de oxigênio, que o torna mais polar e capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água (Pinho et al., 2016). Essa característica aumenta a capacidade do biodiesel de absorver quantidades de água, alterando esse parâmetro de qualidade ao entrar em contato com a umidade do ar (Lôbo et al., 2009; Fregolente et al., 2012; Pinho et al., 2016). Vieira et al. (2007) avaliaram biodiesel de mamona e soja e constataram que em suas misturas com diesel a absorção de água aumenta de acordo com o aumento do teor de biodiesel. Fregolente et al. (2012), em estudo com

biodiesel de soja e sebo bovino, detectaram a absorção de 1500 a 1980 mg kg⁻¹ de água em diferentes temperaturas, teores de 10 a 15 vezes maior que os apresentados por amostras de diesel puro nas mesmas condições. Ao avaliar as misturas de biodiesel e diesel os autores observaram que o aumento da porcentagem de biodiesel aumenta a capacidade da mistura em reter água.

A composição das cadeias carbônicas do diesel e do biodiesel também se mostra distinta. O biodiesel é composto por ésteres de ácidos graxos, e é considerado de mais fácil degradação que o diesel, já que essa estrutura pode ser mais facilmente reconhecida por enzimas microbianas quando comparada aos hidrocarbonetos presentes no diesel (Pinto et al., 2005; Mariano et al., 2008). Do ponto de vista ambiental, essa diferença pode ser muito vantajosa, pois, no caso de um acidente ambiental, a remoção desses contaminantes seria facilitada pela presença de biodiesel. Porém, no armazenamento essa característica é considerada uma desvantagem, já que os microorganismos nativos presentes no combustível podem tornar o sistema mais suscetível às consequências indesejáveis associadas à contaminação microbiana (Zimmer et al., 2013; Bucker et al., 2014; Bento et al., 2016).

A contaminação microbiana de combustíveis armazenados é influenciada por diversos fatores. A presença de água é fundamental para início do desenvolvimento microbiano e em um sistema com combustível estocado ela pode estar presente em quatro fases distintas: água livre, água decantada no fundo do tanque, pequenas quantidades de água dissolvida no combustível e emulsionada na interface óleo/água (Passman, 2013; Bento et al., 2016).

A capacidade microbiana de utilizar o combustível como fonte de carbono também é um fator de grande importância para seu crescimento. Uma vez estabelecida uma condição favorável e iniciado o crescimento é observado o surgimento de uma massa biológica na interface combustível/água a partir de microorganismos presentes no combustível (Gaylarde et al., 1999; Passman & Dobranick, 2005; Meneghetti, Meneghetti & Brito, 2013; Bucker et al., 2014; Zimmer et al., 2017).

Uma maneira de controlar o crescimento de microorganismos em combustíveis durante o armazenamento é a adoção de drenagens frequentes, centrifugação do combustível e limpeza nos tanques de armazenamento (ABNT NBR 15512), medidas que fazem com que a presença de água seja diminuída ou removida

totalmente (Allsopp et al., 2016; Bento et al., 2016). Considerando que o biodiesel dentro do território brasileiro percorre grandes distâncias das usinas produtoras até as distribuidoras de combustíveis, onde é adicionado ao diesel, a incorporação de água é inevitável. Neste sentido, avaliações com diferentes teores de água auxiliariam o entendimento sobre a vulnerabilidade do biodiesel a mudanças químicas e microbiológicas durante o transporte e armazenamento, os quais poderiam influenciar diretamente a deterioração do produto.

Este trabalho visa avaliar o efeito da presença de água em teores distintos sobre uma comunidade microbiana deteriorogênica de biodiesel e sobre a qualidade final do produto estocado. Serão avaliadas propriedades tais como teor de água, estabilidade à oxidação, crescimento microbiano e deterioração do biodiesel durante estocagem simulada.

6.4 MATERIAIS E MÉTODOS

O biodiesel utilizado no experimento foi cedido por uma usina produtora de biodiesel de soja. Este foi recebido no laboratório e processado imediatamente para evitar o acúmulo de água durante o processo. O biodiesel continha 300 ppm de antioxidante terc-butil hidroquinona (TBHQ). Todos os demais materiais utilizados nas análises foram de grau para análise (P.A.).

6.4.1 Avaliação da Influência do Teor de Água em Biodiesel Durante Estocagem Simulada

Com o intuito de avaliar possíveis modificações na qualidade do biodiesel durante a estocagem quanto à estabilidade química e microbiológica, um experimento de estocagem simulada foi monitorado como descrito a seguir.

6.4.1.1 Contaminação do teor de água

Foram montados microcosmos em frascos de vidro contendo 100 mL de biodiesel como fase oleosa e os referidos teores de água como fase aquosa. O biodiesel fornecido foi recebido originalmente com 158 ppm de água, como descrito

no laudo no Anexo C, sendo os frascos abertos somente para o processamento. Foram montadas 3 condições quanto ao teor de água: 200, 2.000 e 100.000 ppm (mg kg^{-1}).

Para o tratamento denominado 200 ppm foi utilizado o biocombustível assim como recebido e processado. Os demais teores de água foram divididos de acordo com a fase aquosa (água ultrapura [A] ou meio mineral Bushnell e Haas [BH] [1941]). Para o tratamento denominado 2.000 ppm uma alíquota de 200 μL de água ultrapura ou meio mineral BH foi adicionada a cada frasco contendo 100 mL de biodiesel, formando uma pequena película imperceptível ao fundo do frasco e/ou sendo dissolvida no biodiesel. Para o tratamento considerado 100.000 ppm foram adicionados 10 mL de água ou meio mineral BH com a mesma finalidade, caracterizando uma fase livre aquosa visível ao fundo do frasco.

6.4.1.2 Contaminação microbiana

O biodiesel com tratamento controle (Tratamento CTE) foi esterilizado por filtração, utilizando um sistema a vácuo em frasco Kitassato e filtro com membranas de porosidade de 0,22 μm (marca Milipore). Outro tratamento a utilizar biodiesel estéril foi o que recebeu inóculo de um fungo filamentososo isolado em estudos anteriores no laboratório LABBIO/UFRGS (*Penicillium simplicissimum* LABBIO4 [Código Genbank: MG595220] – Tratamento PE). Para os demais tratamentos o biodiesel foi utilizado assim como recebido (tratamento RE), ou seja, com a contaminação natural do procedimento de produção e transporte, e acrescido de um inóculo não caracterizado, denominado de Tratamento ASTM.

Os tratamentos que receberam contaminação proposital de microrganismos (ASTM e PE) foram acrescidos de 10^4 células mL^{-1} de inóculos microbianos. O inóculo não caracterizado (ASTM) foi preparado de acordo com a norma ASTM E1259-18 modificada para biodiesel, determinado por diluição seriada decimal e posterior inoculação em meio de cultura para contagem (PCA). O inóculo fúngico (PE), por sua vez, foi preparado a partir de culturas com sete dias de cultivo em ágar batata (BDA). A este cultivo foi adicionado água destilada estéril e 2 mL de um surfactante (Tween 80, preparado na concentração de 0,01%), para facilitar a remoção dos esporos. A solução obtida foi mantida em agitação a 120 rpm a 30 °C

por 24 h na tentativa de esgotar possíveis reservas nutritivas presentes nos esporos. A concentração do inóculo fúngico foi determinada pela contagem dos esporos presentes na solução, em Câmara de Neubauer.

O experimento foi montado em triplicata, com repetições destrutivas, e armazenado sob temperatura e umidade ambiente. O monitoramento foi realizado durante 30 dias, durante os quais temperatura, umidade, aspecto físico dos frascos, crescimento microbiano, teor de água, estabilidade à oxidação e deterioração do biodiesel foram observados.

6.4.1.3 Análises químicas e físicas

A temperatura e umidade foram anotadas durante os 30 dias com intervalos não maiores que 3 dias. O aspecto físico dos frascos foi avaliado com a escala Haze, de acordo com a norma D4176-04 (2014).

O teor de água foi realizado baseado na norma ASTM D6304 com modificações, utilizando o equipamento de Karl Fischer coulométrico da Metrohm modelo 756 com eletrodo de platina sem diafragma, onde uma quantidade de +/- 1 g (diferença de massa) foi injetada ao frasco contendo 100 mL da solução de Karl Fischer Coulométrica APURA MERCK (CombiCoulomat Fritless). A calibração foi realizada utilizando como padrão água ultrapura (10000 mg kg⁻¹) e uma amostra referência de diesel padrão contendo 105 mg kg⁻¹ de água. As análises foram realizadas em triplicata para cada replicata do experimento.

A análise da estabilidade oxidativa foi realizada de acordo com a norma EN 14112, em um equipamento 873 Biodiesel Rancimat (Metrohm). A deterioração do biodiesel, causada pelo teor de água durante o armazenamento ou pela presença e consequente desenvolvimento de microrganismos durante os 30 dias de incubação, foi avaliada por espectroscopia do infravermelho (IV).

6.4.1.4 Análises microbiológicas

O crescimento microbiano foi avaliado estimando-se gravimetricamente a biomassa produzida nas três condições determinadas: PE, RE e ASTM. A biomassa formada foi coletada durante os 30 dias, sendo filtrada em um sistema a vácuo com

discos de papel filtro previamente pesados (Marca J. Prolab, gramatura 80, espessura 205 μm , porosidade 14 μm). Após a retenção da biomassa no filtro foram adicionados 3 mL de hexano para a remoção do excesso de óleo aderido sobre cada disco. Os discos contendo a biomassa foram colocados em estufa a 30°C durante 4 dias para secagem e após mantidos durante 24 h em dessecador. Após esse período, foram pesados em uma balança de precisão (Marca Marte – modelo AL200C). Para o cálculo da biomassa produzida os valores iniciais foram subtraídos dos pesos finais das membranas.

6.4.1.4.1 Análise da comunidade fúngica por Sequenciamento de Alto Rendimento

O tratamento designado como ASTM possui em sua composição uma comunidade microbiana não caracterizada, típica das borras biológicas. Sendo assim, a avaliação das mudanças efetivas causadas pelo teor de água poderia auxiliar a identificar quais grupos entre a comunidade fúngica seriam beneficiados por qual condição aplicada ao experimento. O rastreamento da composição da comunidade fúngica foi escolhido para essa avaliação pois os maiores produtores de biomassa em combustíveis estocados são principalmente representantes do grupo dos fungos.

O tratamento ASTM, então, teve sua composição fúngica avaliada por meio de sequenciamento de alto rendimento, sendo aos 30 dias de avaliação a biomassa produzida nesse tratamento filtrada em membranas de acetato de celulose de 0,22 μm (marca Milipore). Subsequentemente à filtragem, a membrana foi adicionada a tubos do tipo falcon com capacidade para 50 mL, onde foram sequencialmente lavadas com tween 80 (0,01%) com a intenção de remover a maior quantidade de biodiesel sem alterar a microbiota presente na biomassa. Após a adição dessa solução, o material foi centrifugado a 7000 rpm por 20 minutos a 10 °C e a extração de DNA foi realizada a partir do sedimento recolhido.

A extração de DNA da biomassa foi realizada de acordo com as indicações e orientações do fabricante do Kit PowerSoil (MOBIO). Cada triplicata foi utilizada na extração e o DNA resultante foi analisado para pureza, utilizando espectrofotômetro NanodropLite (Nanodrop Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), e quantificado com auxílio do fluorímetro Quantus™ (Promega Corporation, Wisconsin, EUA), utilizando

o Kit QuantiFluor® ONE dsDNA, de acordo com as instruções do fabricante.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificar a comunidade fúngica foram baseados no trabalho de Azambuja et al. (2017) e Borneman e Hartin (2000), cujas sequências amplificam uma porção do gene 18S rDNA e são *Forward* (nu-SSU-0817-5' TTAGCATGGAATAATTRRAATAGGA e *Reverse* (nu-SSU-1196-30) (TCTGGACCTGGTGAGTTTCC), com a adição das sequências de *barcodes* e os adaptadores do Illumina. A reação de PCR foi realizada utilizando 5 µL de Tampão de PCR 10X, 2,5 µL de solução MgCl₂ (50 mM), 200 mM dNTPs, 100 mM de cada primer, 2,5 U de Taq DNA polimerase e aproximadamente 20 ng de DNA, em um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada com uma temperatura de denaturação inicial de 94 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 56 °C por 50 s, e 72 °C por 90 s. Uma etapa final de alongamento por 5 min a 72 °C foi realizada. O produto de PCR foi purificado com auxílio de esferas Agencourt AMPure XP e o preparo da biblioteca foi realizado como descrito pelo fabricante Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, Califórnia, EUA), a partir de uma quantidade inicial de 12,5 ng de produto de PCR. O sequenciamento foi realizado em uma máquina de genoma pessoal do sistema Illumina MiSeq (PGM) (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante.

As análises de bioinformática foram realizadas com o software Qiime 2 (Caporaso et al., 2010). Utilizou-se o FastQC para checar a qualidade das sequências cruas. As sequências R1 e R2 foram acopladas e os oligonucleotídeos e *barcodes* foram removidos. As sequências foram agrupadas com o Usearch61 (Edgar, 2013). Sequências de baixa qualidade (menores que 150 pb) e homopolímeros (sequências < 6pb) foram removidas. As sequências filtradas foram agrupadas utilizando o Uclust e comparadas com o banco de dados Silva (Quast et al., 2013) SSU/LSU versão 132, resultando em uma tabela de unidades taxonômicas. Os parâmetros para identificação das unidades taxonômicas foram 80% de similaridade para filo, 85% para classe, 90% para ordem, 95% para família, 97% para gênero e >97% para espécie.

6.4.2 Análises Estatísticas

Os dados obtidos neste trabalho foram estatisticamente analisados com auxílio do software BioEstat Versão 5.0 (Analystsoft). Análises de variância e Teste de Tukey ao nível de 5% de significância foram realizados. A avaliação dos dados

gerados pela técnica de espectroscopia de infravermelho foi realizada com o auxílio do software Chemostat. Os resultados do sequenciamento de alto rendimento foram analisados por meio do teste de Dunnet (ANOVA) com auxílio do software BioEstat 5.0 (Analystsoft) para comparação dos grupos principais de fungos gerados nos tratamentos por Illumina Miseq em relação ao tempo inicial. A diversidade de grupos de fungos encontradas para as amostras ASTM foi avaliada pelo Índice de Shannon, calculado no software Excel (Microsoft).

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.5.1 Análises Químicas e Físicas

O biodiesel possui 24 parâmetros, químicos e físicos, os quais são responsáveis pela certificação de qualidade necessária para a sua comercialização em território nacional (ANP, 2014). Neste trabalho apenas três desses parâmetros foram detectados.

O experimento foi incubado à temperatura ambiente com o intuito de mimetizar a realidade durante o armazenamento. A umidade relativa do ar (expressa em %) e temperatura (°C) e suas variações foram monitoradas. Os resultados detectados estão expressos na Figura 1. Durante 28 dias de avaliação a temperatura variou entre 15 °C e 23 °C e a umidade relativa do ar ficou entre 48 e 74%. Como discutido anteriormente, o biodiesel é altamente higroscópico e pode absorver grandes quantidades de água somente ao contato com o ar (Vieira et al., 2007; Siegert, 2009; Fregolente et al., 2012; Geary et al., 2016). Essas variáveis foram monitoradas durante todo o tempo de avaliação, sendo os efeitos da temperatura e umidade passíveis de serem detectados posteriormente por meio da análise do teor de água e crescimento microbiano.

Ao longo do experimento, a aparência da fase oleosa foi avaliada para possíveis alterações na sua escala de turbidez e presença de particulados ou impurezas. Cada amostra teve sua turbidez comparada a um quadro padrão, cujos níveis de turbidez vão de 1 (amostra clara) a 6 (alto nível de turbidez). Os resultados observados para as amostras avaliadas neste estudo estão na Tabela 1.

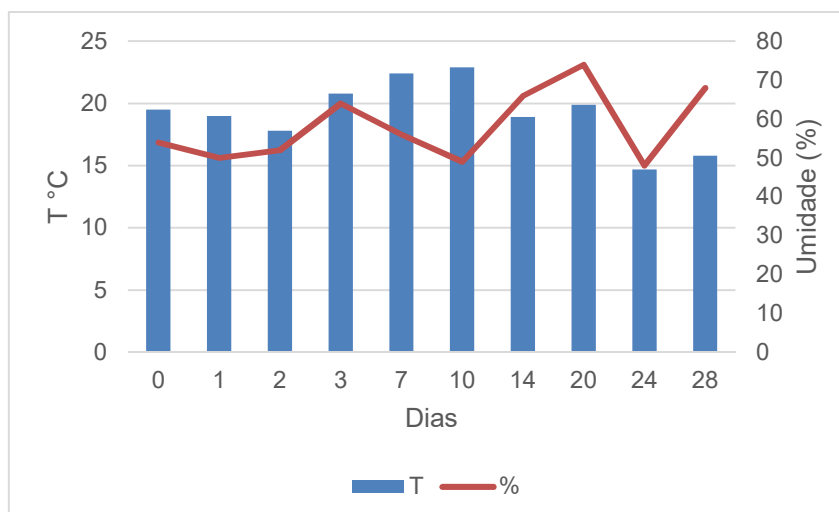


Figura 1 - Variações na temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) durante 28 dias de incubação do experimento.

Tabela 1 - Avaliação da turbidez das amostras oleosas segundo critérios determinados pela escala Haze, de acordo com a norma ASTM D4176.

Tratamentos	Dias					
	0	10	14	21	30	
Controle	200 ppm	1	1	1	1	1
	2.000 ppm BH	1	2	2	3	2
	2.000 ppm água	1	2	2	3	2
	100.000 ppm BH	1	3	3	3	2
	100.000 ppm água	1	3	3	4	2
Recebido	200 ppm	1	1	1	1	1
	2.000 ppm BH	1	2	4	3	2
	2.000 ppm água	1	2	4	4	2
	100.000 ppm BH	1	3	5	4	2
	100.000 ppm água	4	5	6	5	4
P. simplicissimum	200 ppm	1	1	1	1	1
	2.000 ppm BH	1	5	3	3	2
	2.000 ppm água	1	5	5	3	3
	100.000 ppm BH	5	4	2	3	3
	100.000 ppm água	1	6	3	3	2
ASTM	200 ppm	1	1	1	1	1
	2.000 ppm BH	1	3	5	3	2
	2.000 ppm água	1	2	5	3	2
	100.000 ppm BH	3	3	4	3	3
	100.000 ppm água	1	2	3	3	3

As amostras que apresentaram menor turbidez durante o experimento foram aquelas às quais não se adicionou propositalmente água ou meio mineral, em qualquer quantidade, para todos os tratamentos (200 ppm). As amostras nas quais

foram observadas alterações na turbidez atingiram níveis medianos na escala, como o Controle e na condição de adição de um inóculo não caracterizado (Tratamento ASTM). Em contraste, as amostras que apresentaram maior turbidez segundo a escala, nível 6, foram aquelas às quais as maiores quantidades de fases aquosas (100.000 ppm) foram adicionadas, correspondentes aos tratamentos como recebido, e às quais foram adicionados os esporos do fungo (*P. simplicissimum*).

Na Resolução ANP nº. 45/2014 há a descrição de cada propriedade, física e química, que o biodiesel deve apresentar para ser certificado para comercialização. Entre elas está o aspecto visual, sendo que a exigência é que esse se apresente límpido e isento de impurezas. No caso de dúvida, se o teor de água e/ou contaminação total estiverem fora dos conformes, as amostras devem ser descartadas. Fregolente et al. (2012) avaliaram a turbidez entre amostras da mesma origem (B100 ou a mistura B5) e observaram que uma centrifugação, a qual forçaria a separação da água dissolvida do combustível, era suficiente para observar a mudança da escala Haze do nível 6 para o nível 1, aceito pela legislação. Além disso, uma redução na quantidade de água de 50 a 60% foi observada nas amostras centrifugadas. Os dados apresentados na Tabela 1, juntamente com os dados da literatura, nos indicam que a turbidez detectada está relacionada à quantidade de água das amostras, a qual está dissolvida no próprio biodiesel.

Os resultados da avaliação da estabilidade à oxidação pelo biodiesel de soja utilizado no experimento estão apresentados na Figura 2. Pôde-se observar uma redução no tempo de indução, mesmo na presença de antioxidante (TBHQ a 300 ppm), sendo que, após 30 dias, o biodiesel em questão ainda se encontrava dentro das especificações, embora algumas amostras tenham apresentado valores próximos ao limite da Resolução ANP nº. 45/2014 (6 h). Apenas os valores atribuídos aos tratamentos contendo o fungo *P. simplicissimum* não diferiram estatisticamente do tempo zero ($P > 0,05$).

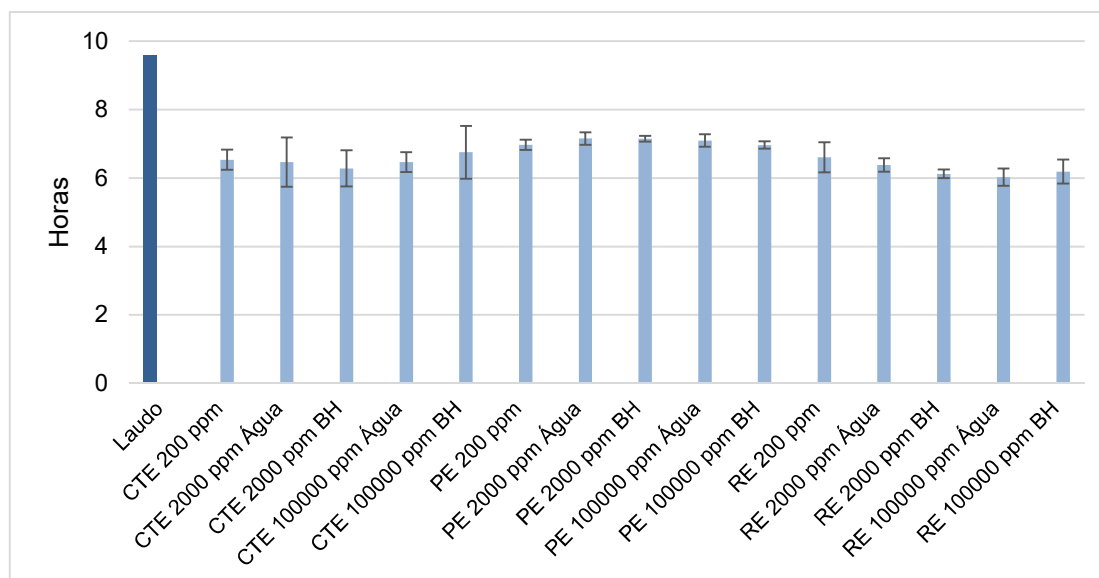


Figura 2 - Índice de estabilidade à oxidação a 110°C da fase oleosa (Rancimat). Limite mínimo preconizado pela Resolução ANP n°. 45/2014 de 6 h.

As condições de temperatura, exposição à água e exposição ao oxigênio são importantes fatores que influenciam a taxa de oxidação (Karavalakis & Stournas, 2010). A presença de água, em especial, tem fortes efeitos sobre as propriedades dos combustíveis e pode acelerar processos de degradação dos ésteres, já que aumenta o potencial de hidrólise destes, diminuindo a qualidade do combustível estocado (Yang et al., 2013; Jakeria et al., 2014). Além disso, como observado em nossos resultados, a presença de água facilita o desenvolvimento de microrganismos, os quais podem afetar a estabilidade à oxidação e catalisar reações de hidrólise do biodiesel, alterando a acidez deste (Dodos et al., 2012).

Após 30 dias de incubação, todas as amostras avaliadas excederam o máximo teor de água estabelecido para o biodiesel pela Resolução ANP n°. 45/2014 (Figura 3). Os teores de água aumentaram significativamente quando comparados ao laudo inicial (158 ppm). As amostras de biodiesel chegaram ao laboratório e foram prontamente processadas para evitar que o conteúdo de água se alterasse pela capacidade do biodiesel em absorver água do ar. As amostras cujo tratamento foi designado 200 ppm aumentaram em média 600% quando comparados ao laudo, com resultados próximos à 1.100 ppm após 30 dias de avaliação. Nessas amostras não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos contaminados e estéril ($P > 0,05$).

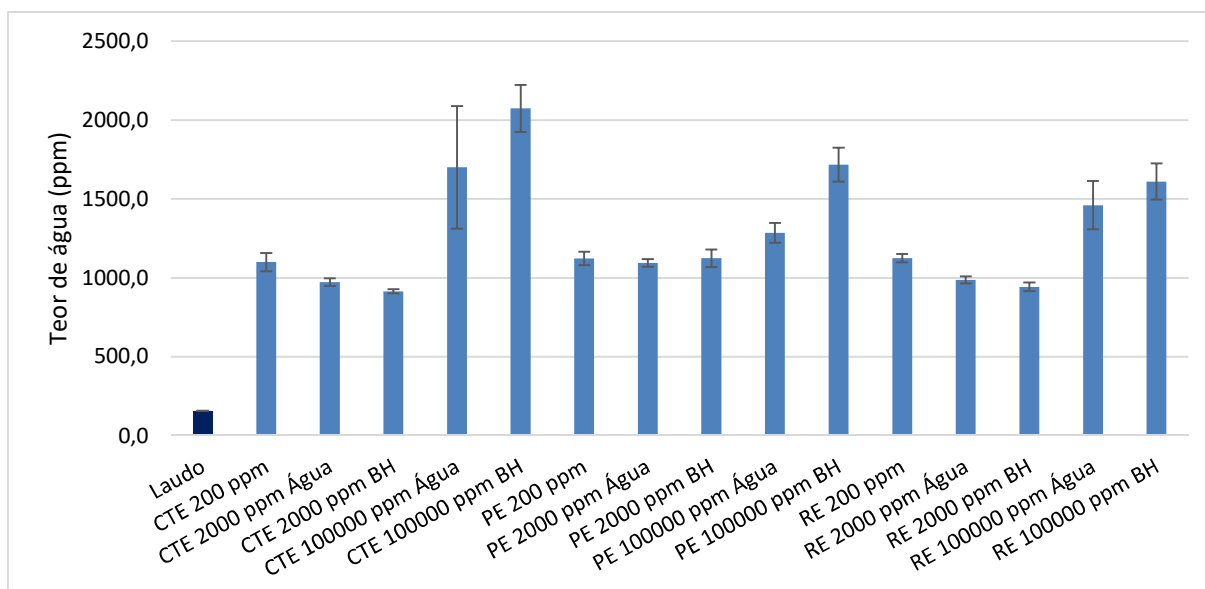


Figura 3 - Teor de água nas amostras de biodiesel determinadas pela técnica de Karl Fischer. Limite máximo preconizado pela Resolução ANP n°. 45/2014 de 200 ppm.

O aumento do teor de água nessas amostras pode ser explicado pela propriedade altamente higroscópica que o biodiesel possui. Durante os 30 dias foram registrados dados de umidade relativa do ar de mais de 48%, chegando a 74% em um dado momento. O tratamento contendo 2.000 ppm também não apresentou diferenças na quantidade de água após 30 dias de incubação, na presença ou ausência de microrganismos e independentemente do tratamento recebido (água MiliQ ou meio BH) ($P > 0,05$). Quando comparado ao laudo, o tratamento com 2.000 ppm apresentou aumento de 470 a 600%.

Os maiores teores de água, conforme o esperado, foram observados para os tratamentos aos quais foi adicionado 100.000 ppm de água MiliQ ou Meio mínimo mineral BH, simulando a presença de água livre. Para o tratamento ao qual foi adicionado 100.000 ppm de água MiliQ, o controle apresentou teores de água maiores quando comparado ao tratamento contendo o fungo filamentososo (PE) ($P < 0,05$). O mesmo pôde ser observado no tratamento com meio mineral BH para esse fungo e com a comunidade microbiana autóctone ($P < 0,05$). A redução na quantidade de água nos tratamentos contaminados na presença de 100.000 ppm de água, adicionada na forma de meio mínimo mineral, pode estar relacionada ao consumo da água dissolvida no metabolismo fúngico, considerando-se que as maiores biomassas foram observadas nesse tratamento.

Os dados apresentados na Figura 3 confirmam a tendência da condição de

equilíbrio para a água passível de ser absorvida pelo biodiesel, e que estaria limitada a faixas de 1.500 a 2.000 ppm, conforme as condições pré-determinadas por este estudo. Fregolente et al. (2012) observaram o biodiesel atingir um equilíbrio na absorção de água após 10 dias de incubação na presença de 10% de água. À temperatura de 20 °C, o biodiesel chegou a absorver 15 vezes mais água do que o diesel, sendo que valores próximos a 2.800 ppm foram detectados para o biodiesel puro às 48 h de incubação, previamente a um processo de centrifugação das amostras. Posteriormente a esse processo, os valores detectados foram de 1.700 ppm.

Passman e Dobranick (2005) observaram um aumento de 300% na quantidade de água presente em amostras de biodiesel após 3 meses de avaliação. Os autores concluíram, a partir dos dados de crescimento microbiano, que esse crescimento não afetou a quantidade de água detectada, visto que um dos tratamentos considerado estéril (controle) apresentou a mesma proporção de aumento no teor de água.

Os resultados observados neste trabalho quando confrontados com a literatura demonstram que pode haver dinâmicas diferentes em sistemas de estocagem quanto à influência do crescimento microbiano no teor de água detectado no biodiesel. O teor de água pode ser dependente de fatores como temperatura, tempo de residência do combustível e rotinas estabelecidas de manutenção dos tanques desde a usina até a distribuidora, passando pelos caminhões-tanque responsáveis pelo transporte. Os microrganismos podem produzir água com seu metabolismo e, ao mesmo tempo, utilizar-se da água dissolvida no biodiesel como suporte para o seu desenvolvimento (Pasmman & Dobranick, 2005; Hill & Hill, 2008; Bento et al., 2016).

6.5.2 Análises Microbiológicas

A avaliação da formação de biomassa nos diferentes teores de água pelos microrganismos avaliados é apresentada na Figura 4. Três níveis diferentes de teor de água no biodiesel foram avaliados, sendo possível detectar diferenças na formação de biomassa. Os maiores valores de biomassa encontradas foram nos tratamentos com maior teor de água (100.000 ppm) e maior aporte de minerais (BH), conforme o

esperado ($P < 0,05$). Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos contaminados com menor teor de água (200 ppm) ao final do experimento ($P > 0,05$).

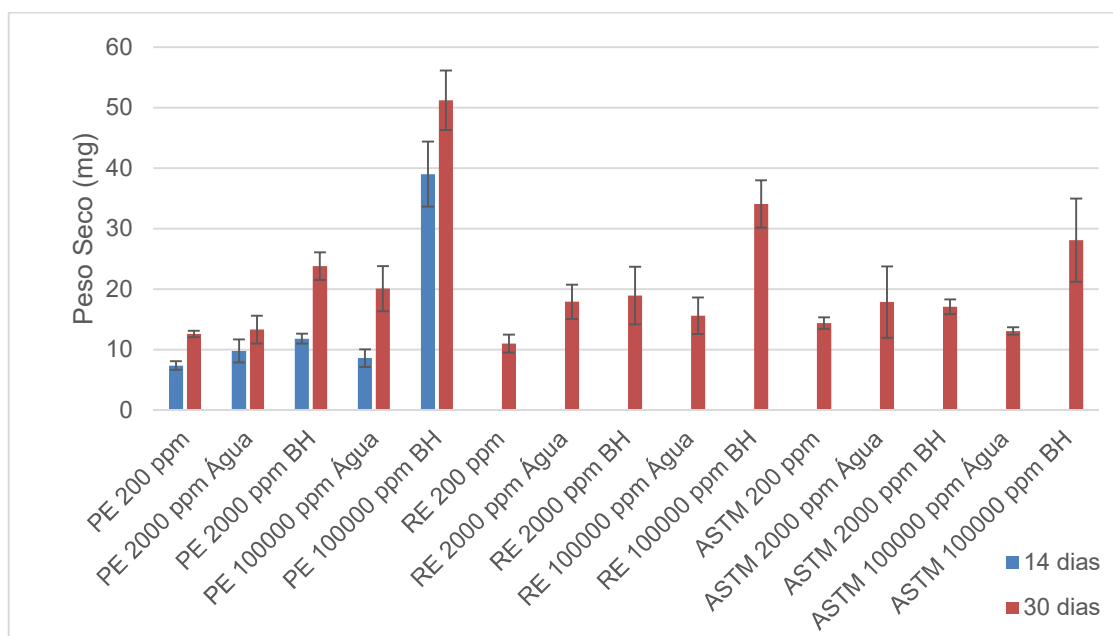


Figura 4 - Valores de biomassa recuperada da interface óleo/água dos tratamentos com diferentes comunidades microbianas em diferentes teores de água, após 14 e 30 dias.

Na condição em que o fungo *P. simplicissimum* foi adicionado, os valores de biomassa foram estimados aos 14 e 30 dias. Os resultados iniciais indicam não haver diferenças significativas, aos 14 dias, entre o crescimento microbiano observado para os teores de água 200 ppm e 2.000 ppm, independentemente do aporte de nutrientes ($P > 0,05$). Além disso, não foram detectadas diferenças entre 200 ppm e o tratamento de 100.000 ppm ao qual foi adicionado Água Miliq ($P > 0,05$) ($8,6 \pm 1,4$ mg), evidenciando que a presença de sais minerais, conforme o esperado, pode impulsionar o crescimento fúngico inicial, como observado no tratamento 100.000 ppm com o meio Bushnell e Haas (1941), simulando uma fase de água livre ($39,0 \pm 5,4$ mg).

Aos 30 dias, os valores de biomassa para o tratamento 200 ppm aumentaram de $7,4 \pm 0,7$ mg para $12,6 \pm 0,5$ mg, porém essa diferença não foi considerada significativa ($P > 0,05$). No mesmo tempo amostral, foram produzidos $51,2 \pm 4,9$ mg na condição com 10 mL de meio mínimo mineral (100.000 ppm BH), um aumento de 24% quando considerado o peso seco obtido desse fungo aos 14 dias de

incubação ($39 \pm 5,4$ mg) ($P < 0,05$). Em contraste, no tratamento ao qual não foi adicionada água, 200 ppm, foram produzidos $12,6 \pm 0,5$ mg, 75% menos do que quando a melhor condição para o crescimento foi aplicada ($P < 0,05$).

No tratamento cujo teor de água foi de 2.000 ppm, não foram observadas diferenças significativas na biomassa produzida, causadas pela presença de nutrientes (tratamentos com água MiliQ ou meio BH) ($P > 0,05$). No entanto, após 30 dias de incubação, a diferença entre os tratamentos foi de 44%, um aumento de 10,5 mg na média de biomassa detectada, sugerindo que em menor quantidade de água e nutrientes o tempo requerido para o desenvolvimento microbiano deve ser maior, o que também foi observado para os demais tratamentos com o fungo filamentosso inoculado.

Na condição com microrganismos nativos (RE), a presença do meio BH na concentração de 100.000 ppm produziu $34,1 \pm 3,9$ mg de biomassa. Quando comparado ao tratamento com a mesma quantidade de água, porém sem nutrientes, esses valores caíram para aproximadamente metade da biomassa produzida ($15,6 \pm 3,0$ mg) ($P < 0,05$). Para essa condição (RE), a biomassa recuperada nos tratamentos contendo 100.000 ppm com água MiliQ e nos tratamentos com 2.000 ppm não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$). Com 200 ppm, no entanto, os valores foram de $11 \pm 1,5$ mg, diferindo do tratamento de 100.000 ppm com meio BH ($P < 0,05$).

A biomassa encontrada nos frascos contendo maior quantidade de água e aporte mineral (100.000 ppm BH), cujo inóculo utilizado foi baseado na norma ASTM E1259, foi 48% maior ($28,1 \pm 6,9$ mg) que o crescimento microbiano detectado no tratamento com 200 ppm ($14,4 \pm 0,9$ mg). As mesmas influências observadas no tratamento RE e PE aos 14 dias foram observadas para esse tratamento. Neste caso, confirma-se que tanto a água quanto os nutrientes minerais são fatores limitantes do crescimento microbiano. Apenas quando a variável tempo foi aplicada, o fungo isolado apresentou diferenças quanto ao aporte mineral e a presença de água. Além disso, podemos confirmar que a água, mesmo em baixa concentração (200 ppm), dissolvida na fase oleosa, promove o crescimento microbiano. Esses resultados alertam para a chegada aos tanques de armazenamento de um biodiesel que, mesmo com baixa contaminação microbiana, com o passar do tempo de estocagem pode acusar a presença de borra biológica.

A atividade e o conseqüente crescimento microbiano somente são

possíveis na presença de água, cuja ausência pode causar a morte celular e a sobrevivência apenas de microrganismos com formas esporuladas (em estágio de dormência). Sendo assim, para que microrganismos se desenvolvam em combustíveis, primeiramente, é necessário que aqueles estejam presentes neste e, ainda, que haja uma quantidade de água mínima para promover o desenvolvimento microbiano (Siegert, 2009; Allsopp, 2016). Em geral, 100 ppm de água, considerada insignificante ao olho humano, já é capaz de induzir a germinação de esporos e multiplicação celular (Siegert, 2009).

Hill e Hill (2009) observaram o efeito da presença de água na atividade microbiana em biodiesel. Os autores concluíram que se pode esperar um número muito maior de microrganismos recuperados de tanques de estocagem com água na fase livre, ou seja, quanto maior a quantidade de água presente no sistema, maior a comunidade microbiana se desenvolverá às expensas do combustível durante o armazenamento. Posteriormente, foi avaliada a influência do conteúdo de água e da porcentagem de biodiesel em misturas com diesel quanto à susceptibilidade à contaminação microbiana. Hill et al. (2017) concluíram que as porcentagens de água e biodiesel estão intimamente ligadas à contaminação microbiana, sendo que quanto maior o teor de água em misturas com maiores teores de biodiesel, maior o crescimento microbiano detectado.

Os resultados obtidos neste trabalho também apontam para a mesma tendência observada pela literatura, sendo que nos tratamentos com maiores quantidades de água (100.000 ppm) foram detectadas as maiores biomassas. Para os tratamentos em cujos maiores valores de biomassas foram encontrados, os valores de pH foram avaliados ao final dos 30 dias, e estão apresentados na Figura 5.

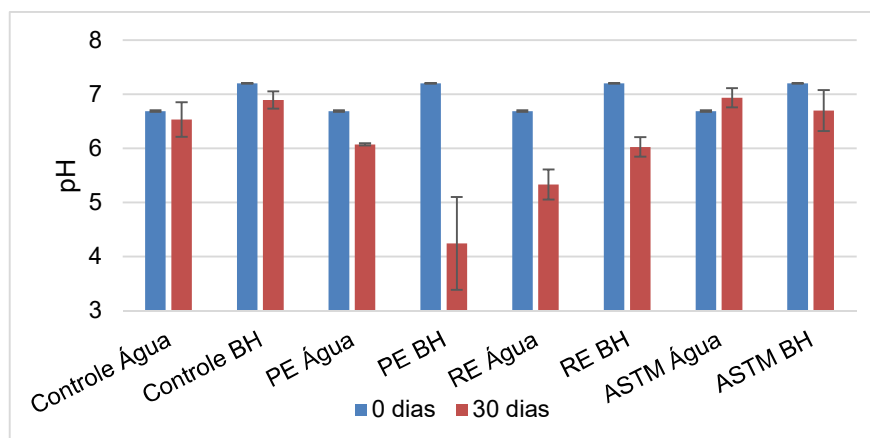


Figura 5 - Valores de pH observados aos 30 dias de experimento para os tratamentos com maiores teores de água.

Os tratamentos controles não diferiram estatisticamente, em nenhum tempo amostral, dos valores de pH determinados inicialmente ($P > 0,05$). Na condição em que o fungo filamentoso foi avaliado, quando comparados aos controles, foi detectado um decréscimo nos valores de pH de 9% para o tratamento com água MiliQ ($6,07 \pm 0,02$), considerado sem diferença significativa ($P > 0,05$), e de 41% para o tratamento com meio BH ($4,24 \pm 0,85$) ($P < 0,05$). Os valores de pH das fases aquosas diferiram quanto às condições com diferentes aportes minerais ($P < 0,05$), confirmando que quando ocorreu crescimento fúngico a produção de metabólitos com caráter ácido também pôde ser observada.

Para o tratamento como recebido (RE) os valores encontrados de pH para as amostras contendo água MiliQ e Meio BH após 30 dias foram de $5,3 \pm 0,3$ e $6,02 \pm 0,2$, representando uma redução de 20% e 16% quando relacionado aos controles, respectivamente. Apesar de haver uma relação similar entre as biomassas encontradas nos tratamentos RE e ASTM, os valores de pH dos tratamentos ASTM (com água MiliQ e meio BH) não apresentaram diferenças estatísticas entre os valores encontrados para os controles e tempos iniciais ($P < 0,05$).

A acidificação do sistema de estocagem pode afetar a qualidade do combustível estocado e levar a processos de corrosão interna dos tanques (Passman & Dobranick, 2005; Bento et al., 2005; Hill & Hill, 2008; Bucker et al., 2011). A redução do pH da fase aquosa é uma consequência da ação microbiana sobre hidrocarbonetos, sendo que esse processo está intimamente ligado à produção de água como um co-produto, juntamente com ácidos de cadeia curta e outros produtos (Passman & Dobranick, 2005; Hill & Hill, 2008; Ching et al., 2016). O crescimento de

fungos em biodiesel, por exemplo, é capaz de reduzir em média 25% os valores de pH do meio Bushnell e Haas (1941) em 30 dias (Ching et al., 2016). Bento (2001) testou o efeito de tamponamento do meio mineral Bushnell e Haas (1941) e verificou que para ocorrer a variação de 7,2 para 6,4 foi necessário a adição de 1 mL de HCl (0,1 N) em 50 mL de meio. Em nosso trabalho, durante 30 dias, foi possível observar a redução do pH nos tratamentos contaminados tanto para a microbiota autóctone do biodiesel utilizado no estudo (RE) como para um fungo filamentosso isolado (PE). Apenas o tratamento ASTM não apresentou uma redução estatística nos valores detectados.

No tratamento com o fungo filamentosso *P. simplicissimum* (PE) e com o meio BH foi observada uma redução do pH, provavelmente devido à produção de ácidos orgânicos. O fungo pode ter metabolizado fosfatos presentes no meio BH em sua biomassa. Bento *et al.* (2005), avaliando o meio mineral Bushnell e Haas (1941), encontraram um pH de 4,8 ao final de 60 dias de estocagem simulada, correlacionando-o ao consumo dos fosfatos presentes no meio pelo microrganismo *Aspergillus fumigatus*. A presença de ácido propiônico foi identificada como um dos metabólitos resultantes do metabolismo fúngico e principal causador da queda do pH observado.

Aos 30 dias de incubação, a comunidade fúngica presente no tratamento com inóculo não caracterizado (ASTM) foi avaliada quanto à sua composição a partir do DNA total extraído da biomassa. Foi possível classificar os microrganismos presentes no inóculo com base nas sequências de DNA obtidas pelo sequenciamento ao nível de filo e classes. Um total de 1.251.921,00 sequências foram obtidas pra os seis tratamentos avaliados, estando os valores de cada tratamento expressos na Tabela 2. As abundâncias relativas aos grupos encontrados ($\geq 0,1\%$) estão apresentadas na Figura 6. Os filios Basidiomicota e Ascomicota foram os mais representativos, sendo que o último foi detectado em todos os tratamentos, inicial e final. O filo Basidiomicota não foi detectado nas amostras dos tratamentos com maiores teores de água e aporte de nutrientes (2000 ppm BH, 100.000 ppm Água e 100.000 ppm BH). O filo Chitridiomicota, representado apenas por uma classe (Chitridiomicetes), foi observado em valores menores que 0,04% no tratamento 200 ppm, porém nos demais tratamentos não foi detectada sequência relacionada a esse grupo de fungos.

Tabela 2 - Valores totais de seqüências obtidas por Sequenciamento de Alto Rendimento para o tratamento ASTM e respectivos Índices de Diversidade de Shannon para cada teor de água avaliado.

	Inicial	200 ppm	2.000 ppm água	2.000 ppm BH	100.000 ppm água	100.000 ppm BH
Quantidade total de seqüências	166.960,00	152.689,00	246.879,00	240.361,00	176.482,00	268.550,00
Índice de Diversidade de Shannon	1,10	1,37	0,92	0,08	0,93	1,26

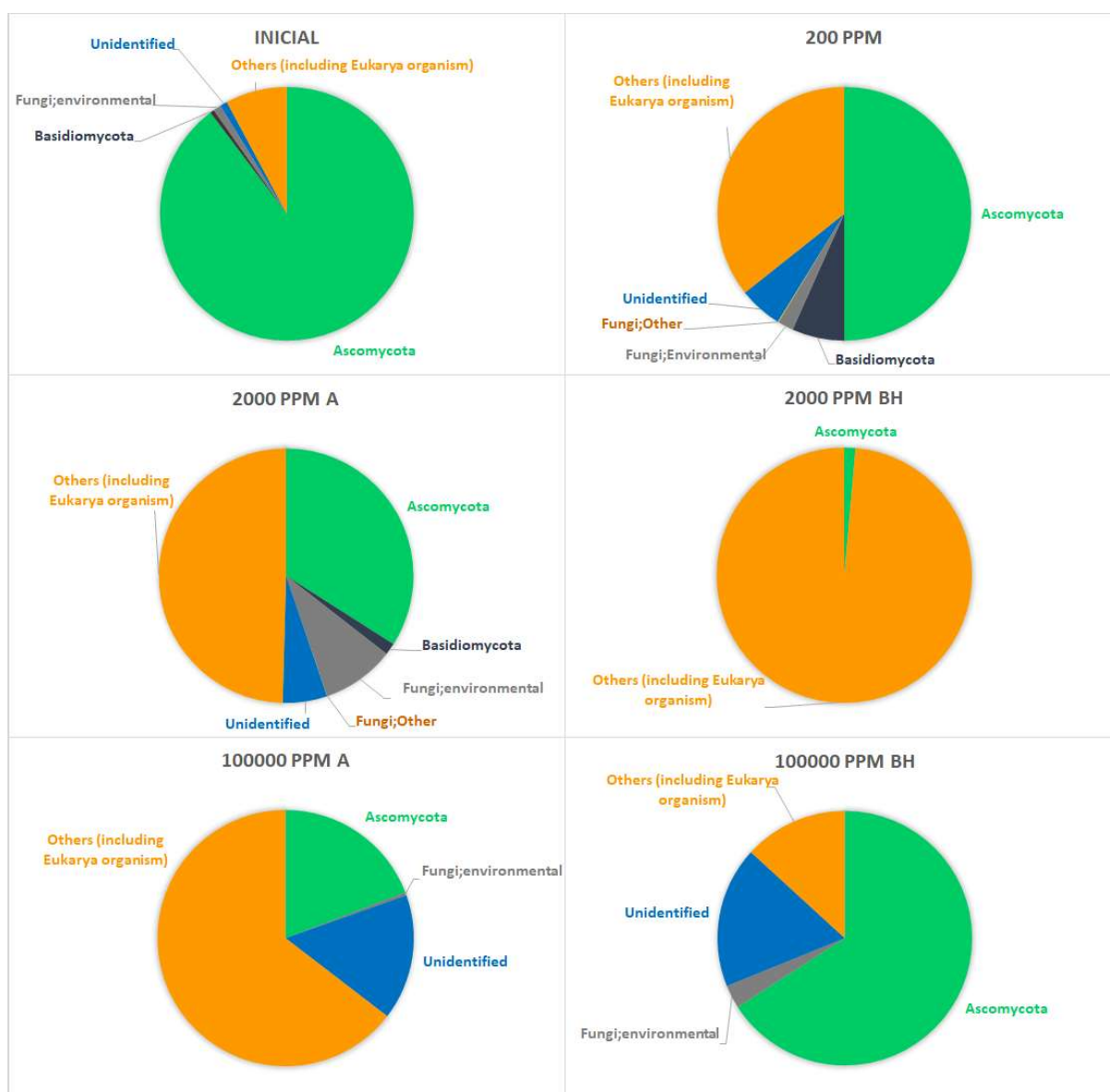


Figura 6 - Abundância relativa dos grupos fúngicos até nível de Filo encontrados nas amostras do tratamento com um inóculo não caracterizado (ASTM).

A baixa incidência desses grupos em amostras de óleo diesel com teores diferentes de enxofre já foi identificada em trabalhos anteriores, nos quais os filios

Chytridiomycota, Basidiomycota e Glomeromycota apresentaram abundância igual ou inferior a 0,1% (Azambuja et al., 2017). Por meio da abordagem microbiológica de isolamento de microrganismos cultivável, foi observado que a maioria dos isolados de combustíveis como diesel, biodiesel e querosene, indicados por Allsopp et al. (2016), são pertencentes ao filo Ascomycota.

Mais de 99% dos microrganismos não podem ser cultivados, além de haver, ainda, uma gama muito grande de microrganismos não identificados (Srivastava et al., 2019). Em nossas amostras pôde-se observar um aumento nas sequências cuja identificação é deficiente, no entanto, devido à grande diversidade de número de sequências entre as replicatas, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

As classes identificadas pela técnica de sequenciamento de alto rendimento estão apresentadas na Figura 7. Ao todo foram observadas três classes pertencentes ao filo Ascomycota: Saccharomicetes, Schizosaccharomicetes e Taphrinomicetes. Representantes do filo Ascomycota são microrganismos considerados sapróbios, patógenos de plantas e animais, simbioses de algas (líquens), plantas (micorrizas e endófitos) e insetos e podem ser terrestres e aquáticos (Harms et al., 2011). A classe Saccharomicetes foi a mais abundante, aparecendo em todos os tratamentos e chegando a representar mais de 50% no tratamento 100.000 ppm com o meio Bushnell e Haas (BH). De acordo com as análises de ANOVA, não foram observadas diferenças significativas nas densidades detectadas para essa classe nos tratamentos avaliados ($P > 0,05$). Gêneros de leveduras como *Candida*, *Sacharomyces*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Hansenula* e *Geotrichium* fazem parte desse grupo e alguns espécimes desses gêneros já foram isolados e identificados em combustíveis, bem como tiveram seu potencial deteriorogênico de biodiesel avaliado (Bücker et al., 2011; Chandran et al., 2011; Soriano et al., 2015; Allsopp et al., 2016; Boelter et al., 2018). As demais classes pertencentes ao filo Ascomycota não superaram 0,01% de abundância quando comparadas aos demais grupos, em todos os tratamentos, sendo que para o tratamento 2.000 ppm BH essas classes foram inexistentes.

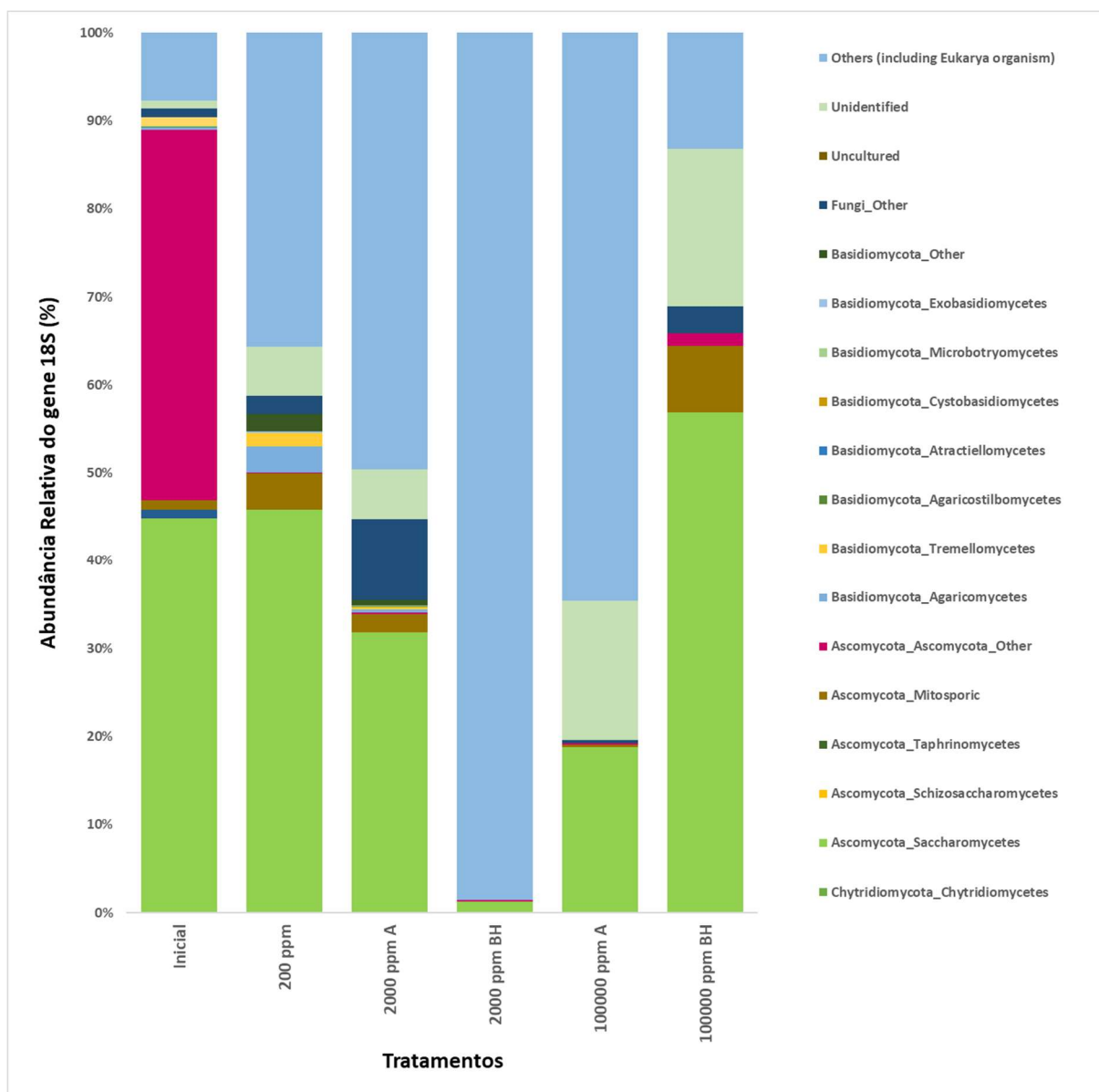


Figura 7 - Abundância relativa dos grupos fúngicos até nível de classes encontrados nas amostras do tratamento com um inóculo não caracterizado (ASTM).

Um total de sete classes foram observadas para o filo Basidiomycota, entre elas Agaricomycetes, Tremellomycetes, Agaricostilbomicetes, Atractiellomycetes, Cystobasidiomycetes, Microbotryomycetes e Exobasidiomycetes. As classes mais abundantes foram Agaricomycetes e Tremellomycetes, as quais atingiram porcentagens de 2 e 1%, respectivamente, no tratamento 200 ppm. Tratamentos com maiores teores de água não registraram a presença de representantes das classes identificadas para esse filo.

O filo Basidiomycota possui uma gama de espécies potenciais degradadores de diversos materiais, como madeira, alcanos, fenóis, petróleo cru,

alcanos, compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e os xilenos), óleo cru, alcatrão de carvão, pesticidas, corantes e polímeros sintéticos, cresóis e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Baldrian & Valášková, 2008; Harms et al., 2011; Mallo et al., 2017). Sendo assim, sua presença, mesmo em baixas porcentagens, não pôde ser desconsiderada.

O grande número de sequências atribuídas a “Outros grupos (incluindo outros eucariotos)” obtidas para todos os tratamentos e observadas tanto na Figura 3 quanto na Figura 4 pode estar relacionado ao oligonucleotídeo utilizado para o gene 18S rDNA. Esses oligonucleotídeos visam selecionar principais filós fúngicos, porém existem limitações em estudos de diversidade fúngica em comparação àqueles que amplificam a região ITS (Borneman & Hartin, 2000; Tedersoo et al., 2018). Borneman e Hartin (2000) observaram a especificidade dos mesmos primers usando o banco de dados do Genbank e detectaram mais de 15% de não conformidade com microrganismos do grupo dos fungos.

A diversidade encontrada para cada tratamento foi analisada por meio do Índice de Diversidade de Shannon (H'), o qual avalia a importância da riqueza e das abundâncias relativas de espécies para cada grupo. Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 1. Quanto maior o valor de H' , maior a diversidade de espécies encontradas no tratamento. Podemos observar que os maiores valores encontrados para esse índice foram nos tratamentos de 200 ppm, 2.000 ppm Água, 100.000 ppm BH e no inóculo inicial. O tratamento 2000 foi responsável pelo menor valor de H' observado entre os tratamentos. Os dados encontrados informam uma representatividade de 98% da categoria “Outros grupos (incluindo outros eucariotos)” no tratamento 2.000 ppm BH, evidenciando a grande inespecificidade do primer, bem como sugere uma seleção dos grupos identificados pela presença do meio mínimo mineral Bushnell e Haas (1941).

Para os demais tratamentos com menores teores de água (200 ppm e 2.000 ppm Água) pôde-se observar um aumento dos valores de H' , quando comparados ao inicial. Classes como Schizosaccharomicetes, Agaricomycetes e Tremellomycetes foram mais detectadas nos tratamentos 200 ppm e 2.000 ppm Água após 30 dias de incubação. Esses resultados sugerem que as variáveis tempo e acúmulo de água podem favorecer o crescimento de alguns grupos de microrganismos, provavelmente detriogênicos, capazes de desenvolver-se e

produzir a biomassa detectada (Figura 4).

Nos tratamentos com maiores teores de água pôde-se ver uma diferença entre os valores de H' , para os quais 0,93 e 1,26 foram obtidos para 100.000 ppm Água e 100.000 ppm BH, respectivamente. A Classe Saccharomicetes, por exemplo, apresentou um aumento de 25%, quando comparada ao inóculo ASTM (inicial). Leff et al. (2015) observaram o crescimento de comunidades microbianas em pastagem e observaram que a disponibilidade de nutrientes provocou alterações na composição das comunidades microbianas, sendo os grupos microbianos que possuem certas características funcionais mais abundantes. A disponibilidade de minerais como nitrogênio, fósforo e ferro é um fator essencial para espécies fúngicas e muitos estudos são baseados na adição desses nutrientes como uma solução de sais minerais, resultando em um desenvolvimento maior de fungos em um sistema de combustível (Srivastava & Nandan, 2012). A maior biomassa encontrada para o tratamento ASTM foi no tratamento 100.000 ppm com a adição do meio BH, o qual forneceu um melhor aporte de nutrientes. De posse desses resultados podemos concluir que a presença de nutrientes selecionou os grupos durante o crescimento em biodiesel.

6.5.3 Infravermelho

O conjunto de espectros gerado para todos os tratamentos por meio da técnica de infravermelho referente às amostras de B100 do experimento é mostrado na Figura 8. Os dados espectrais de todos os tratamentos foram avaliados pela perspectiva da análise de componentes principais (PCA) e por agrupamento hierárquico (HCA).

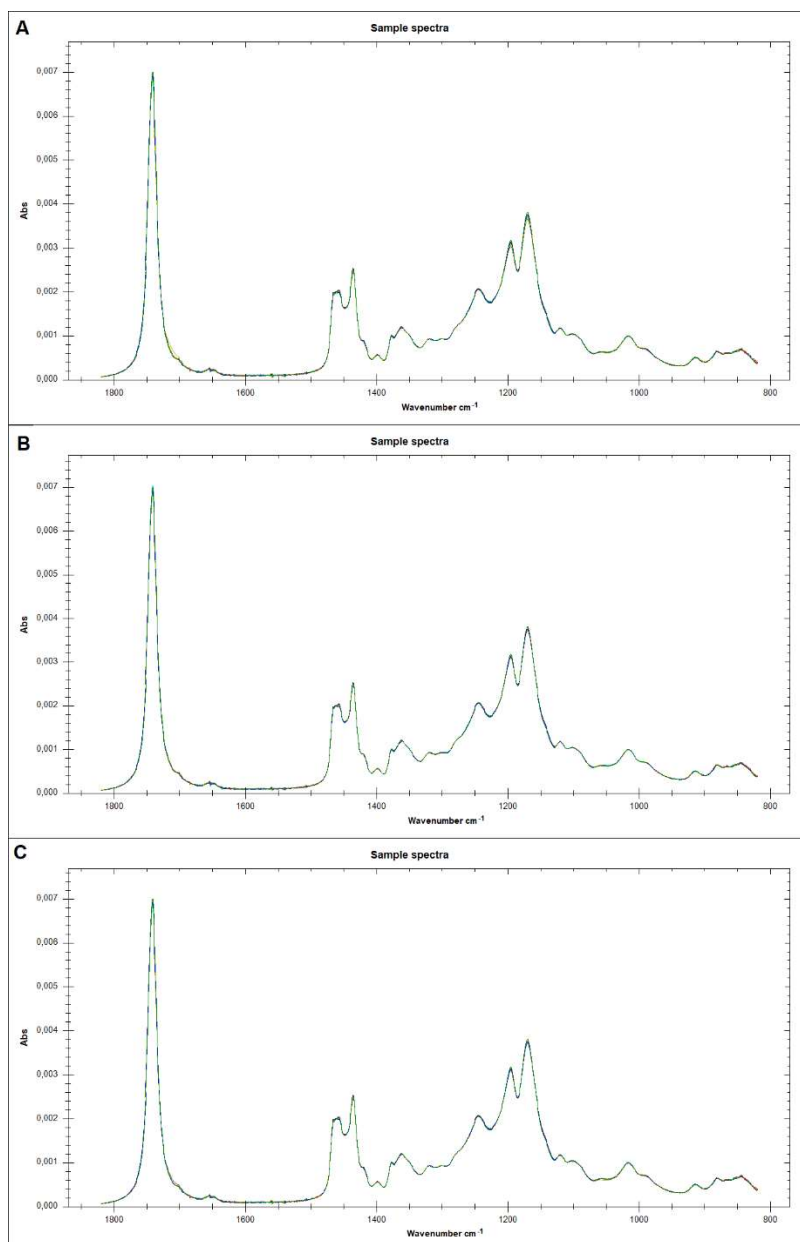


Figura 8 - Espectros obtidos pela técnica de infravermelho das fases oleosas (biodiesel) das condições ASTM (A), RE (B) e PE (C), comparados aos controles (CTE) e tempo inicial (B100).

Os resultados indicam que para as amostras controles e nos tempos iniciais não foram observadas diferenças relativas à estrutura dos ésteres de ácidos graxos presentes. De acordo com o gráfico de pesos, expressos na Figura 9, quando comparamos essas amostras com a amostra contaminada Como Recebido podemos observar que a PC1 está relacionada com o tempo e a degradação da carbonila, as amostras do tempo inicial se separam das demais no gráfico.

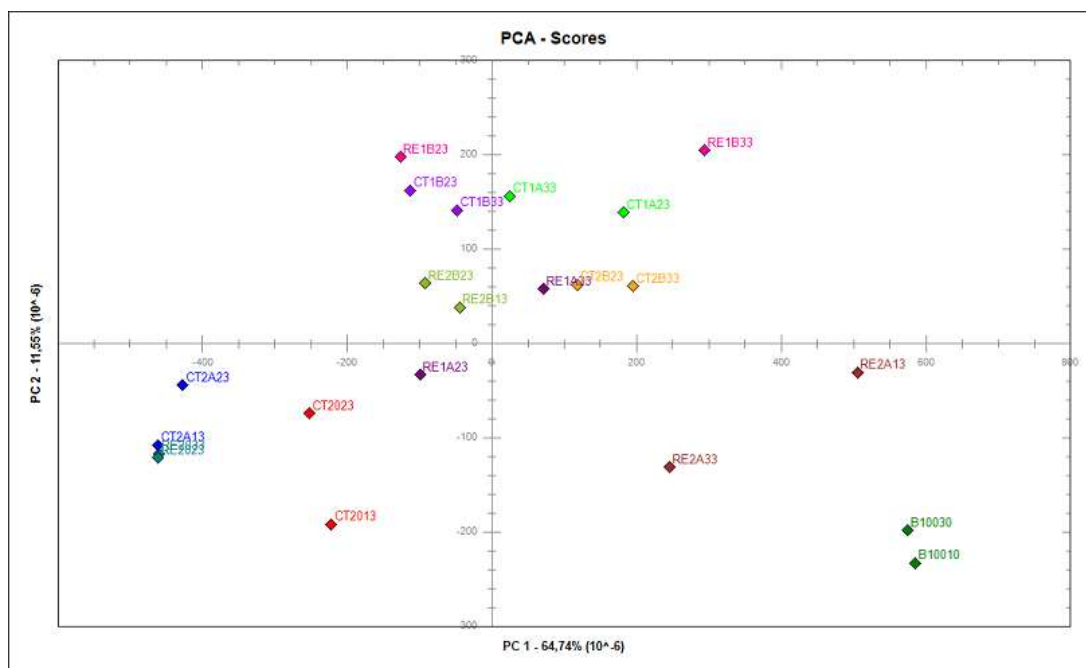


Figura 9 - Análise de componentes principais (PCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos controle (CT) e como recebido (RE) em tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A; 2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B).

A PC2, nesse caso, nos mostra a influência da concentração de água. A maior parte das amostras contendo 100.000 ppm estão separadas das amostras que tiveram adição de água e meio BH de 2.000 ppm e 200 ppm, isso sendo explicado devido à água ter uma de suas bandas características próxima a 1735 cm^{-1} . Não houve diferenças entre as amostras contaminadas e as amostras controle, evidenciando que, se houve degradação essa foi de natureza abiótica. De acordo com os dados apresentados pela PCA e pelo agrupamento hierárquico (HCA) (Figura 10) para o tratamento como recebido (RE) não foi possível observar alteração da composição das cadeias carbônicas presentes nas amostras.

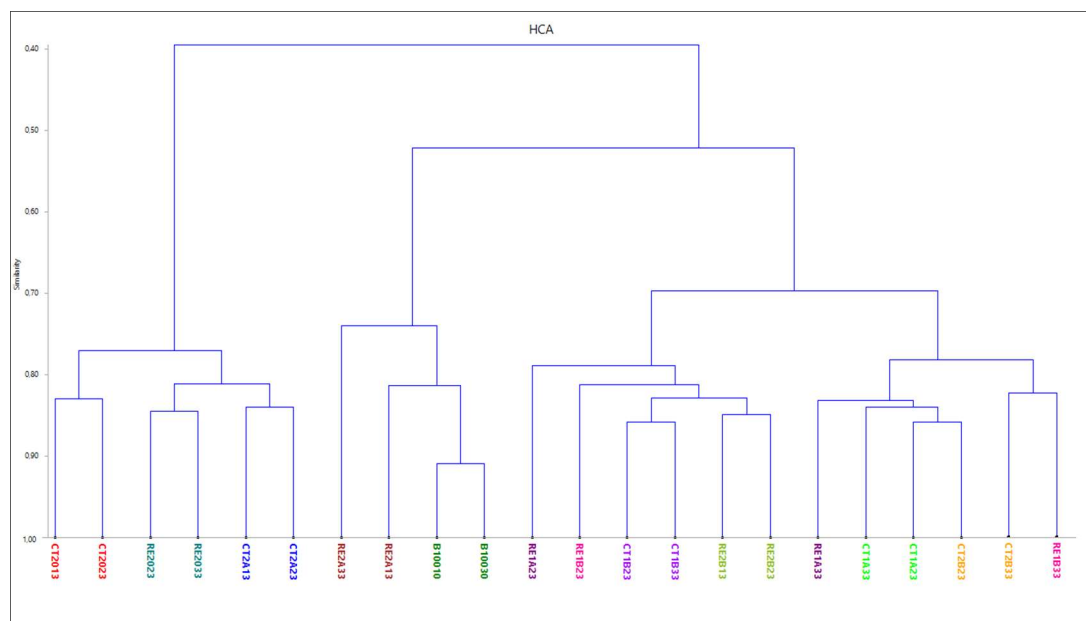


Figura 10 - Agrupamento hierárquico (HCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos controle (CT) e como recebido (RE) em tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A; 2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B).

A estabilidade do biodiesel durante o armazenamento e a sua suscetibilidade à deterioração causada por fatores químicos e físicos já é bem relatada pela literatura (Jakeria et al., 2014). A permanência do biodiesel durante 30 dias nas condições aplicadas ao experimento favoreceu os resultados observados, indicando que a comunidade microbiana presente no tratamento RE poderia exigir mais tempo para que, nessas condições, causasse degradação de origem biológica ao produto.

Os resultados de PCA e HCA para o tratamento ASTM estão demonstrados nas Figuras 11 e 12. Quando comparamos os dados com o tratamento contaminado denominado ASTM, a PC1 (Figura 11) retrata a degradação da carbonila, a parte positiva mostra os grupos que mantiveram a carbonila (controle e tempo inicial) e a negativa, os tratamentos contaminados (2.000 ppm e 100.000 ppm com água e meio BH), indicando haver aqui uma influência na contaminação microbiana na composição química do biodiesel após 30 dias de incubação. O gráfico de pesos da PC2 (Figura 11), por sua vez, mostra novamente uma banda, como a da água, na região de 1735 cm^{-1} . Os resultados observados em ambas análises de PCA e HCA indicam que essas amostras se separaram em dois grandes grupos, sugerindo uma degradação causada pela comunidade microbiana presente na contaminação detectada.

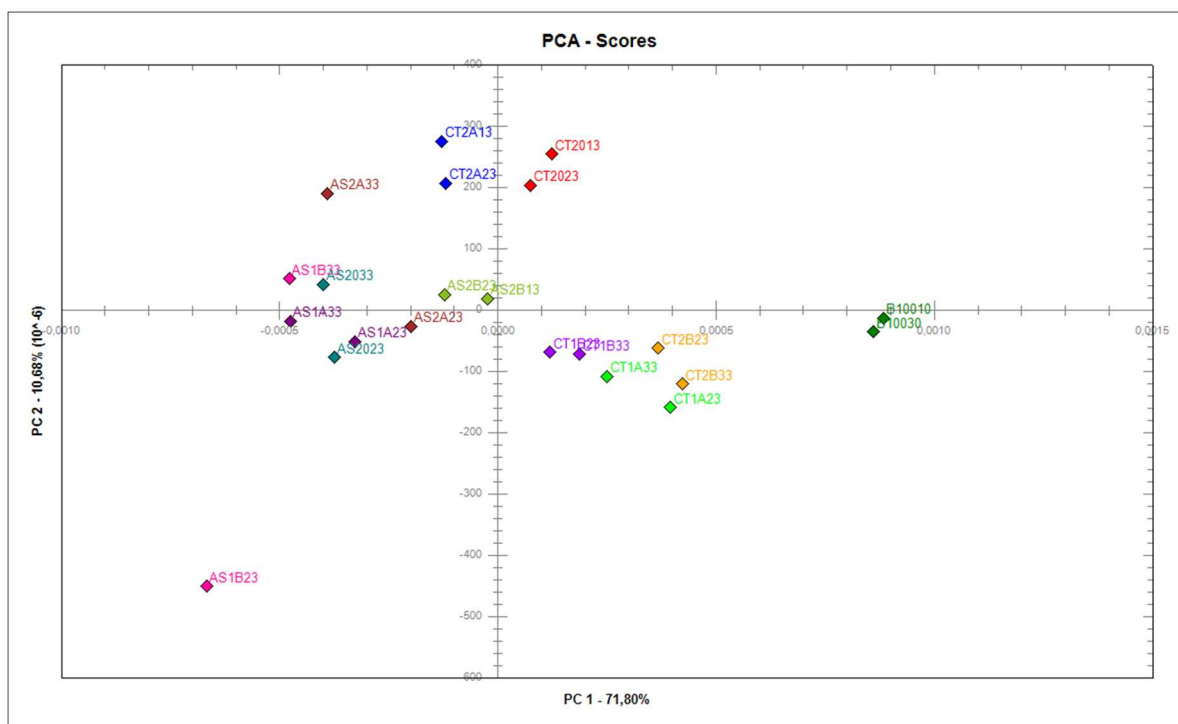


Figura 11 - Análise de componentes principais (PCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos controle (CT) e ASTM nos tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A; 2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B).

A comunidade microbiana presente no inóculo ASTM e caracterizada na Figura 7 foi responsável pela biodegradação observada no biodiesel durante os 30 dias de avaliação. Foi possível observar classes de fungos distintas, porém os maiores representantes dos grupos detectados já foram observados em trabalhos envolvendo deterioração e degradação de combustíveis e outros xenobióticos (Bento et al., 2005; Bucker et al., 2011; Cazarolli et al., 2016; Ye et al., 2017; Azambuja et al., 2017). Dentro de uma comunidade microbiana, vários perfis metabólicos podem ser observados, sendo assim, na natureza, a degradação total de uma molécula xenobiótica pode ser resultado da ação de vários microrganismos em conjunto (Kocamemi & Çeçen, 2010; Jagtap & Bapat, 2017).

O cometabolismo ocorre quando um substrato é utilizado por um microrganismo e o efeito do seu metabolismo resulta em outros compostos, os quais são consumidos por outros táxons (Ye et al., 2017). A presença de uma comunidade fúngica diversa no inóculo ASTM é compatível com os resultados observados. Maiores tempos de estocagem poderiam resultar em maiores diferenças entre os grupos, bem como em uma maior biomassa resultante do crescimento dos microrganismos.

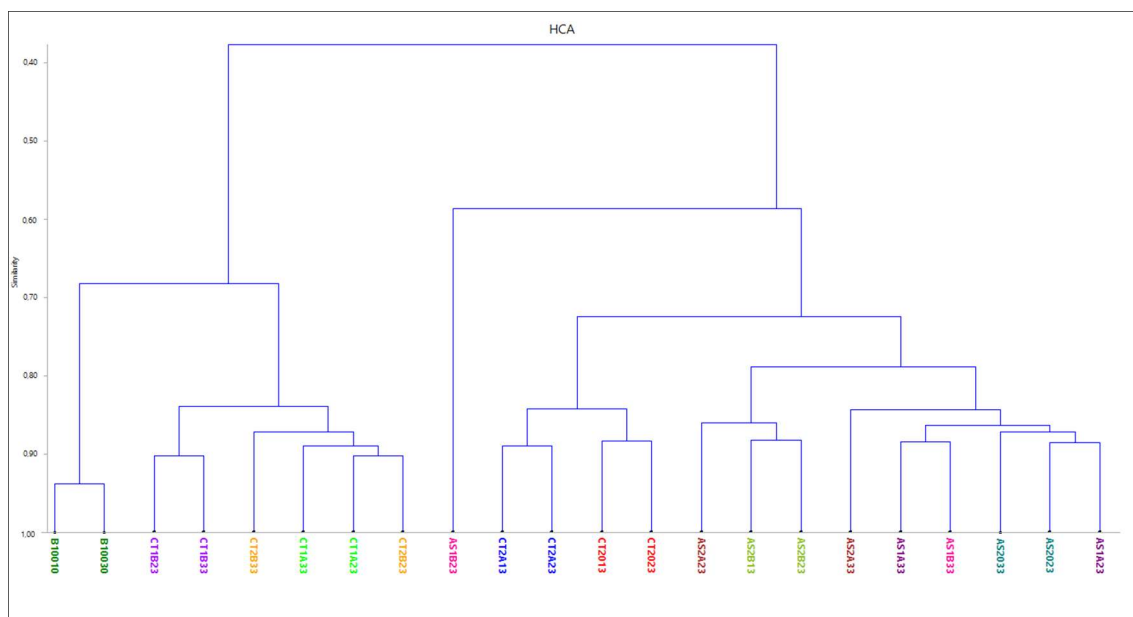


Figura 12 - Agrupamento hierárquico (HCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos controle (CT) e ASTM aos tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A; 2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B).

Os dados referentes à análise da fase oleosa proveniente do crescimento do fungo *P. simplicissimum* estão demonstrados nas Figuras 13 e 14. Quando observamos o crescimento do fungo *P. simplicissimum* por meio dos escores da PCA e dos pesos de cada componente principal, podemos inferir que o tempo de incubação teve mais interferência nas modificações das cadeias carbônicas do biodiesel do que a presença do microrganismo em si. A PC1 separou as amostras do biodiesel no tempo inicial das demais amostras, passados 30 dias. A PC2, por sua vez, mostrou, outra vez, a influência da concentração de água. Amostras com 100.000 ppm se localizam na parte positiva enquanto as com 200 ppm e 2.000 ppm, na parte negativa. Para esse fungo em específico, a análise da PC3 mostrou, no entanto, que o grupo com *P. simplicissimum* e 100.000 ppm de água (com o meio BH) apresentou grandes diferenças do restante das amostras, identificando essa diferença como uma degradação, embora pequena, dos ésteres do biodiesel causada pela presença do fungo nas amostras.

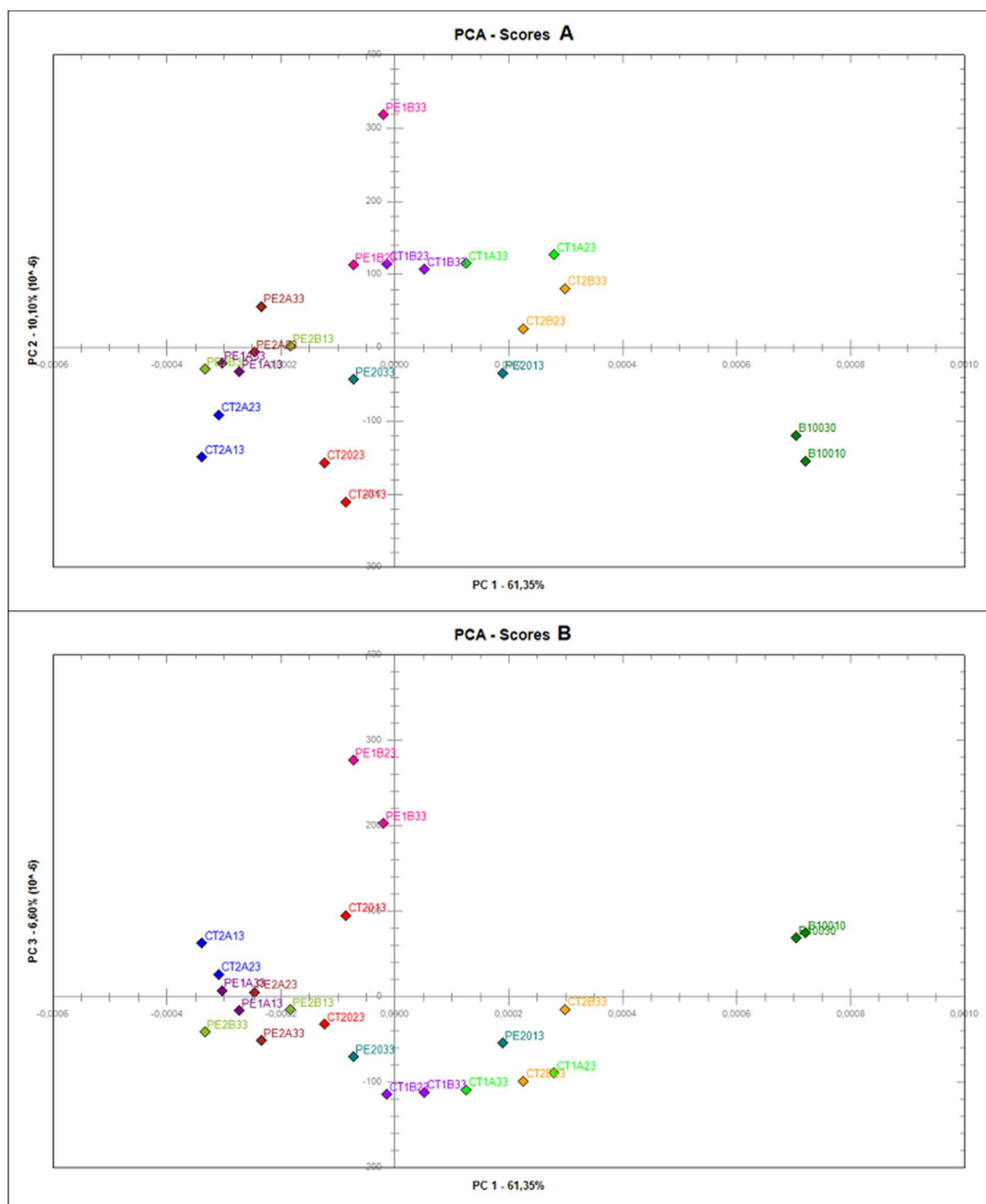


Figura 13 - Análise de componentes principais (PCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos controle (CT) e com o fungo *P. simplicissimum* (PE) nos tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A; 2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B).

Esse resultado fica evidenciado quando observamos o gráfico de HCA, onde vemos dois grupos formados, separando as amostras do tempo inicial das demais, e entre as últimas, quatro grupos podem ser observados. Quando observamos esses grupos evidenciamos a separação das amostras com 100.000 ppm com meio BH das demais. Esse tratamento foi o tratamento com maior biomassa e

consequente redução do pH, indicativo de metabolismo microbiano.

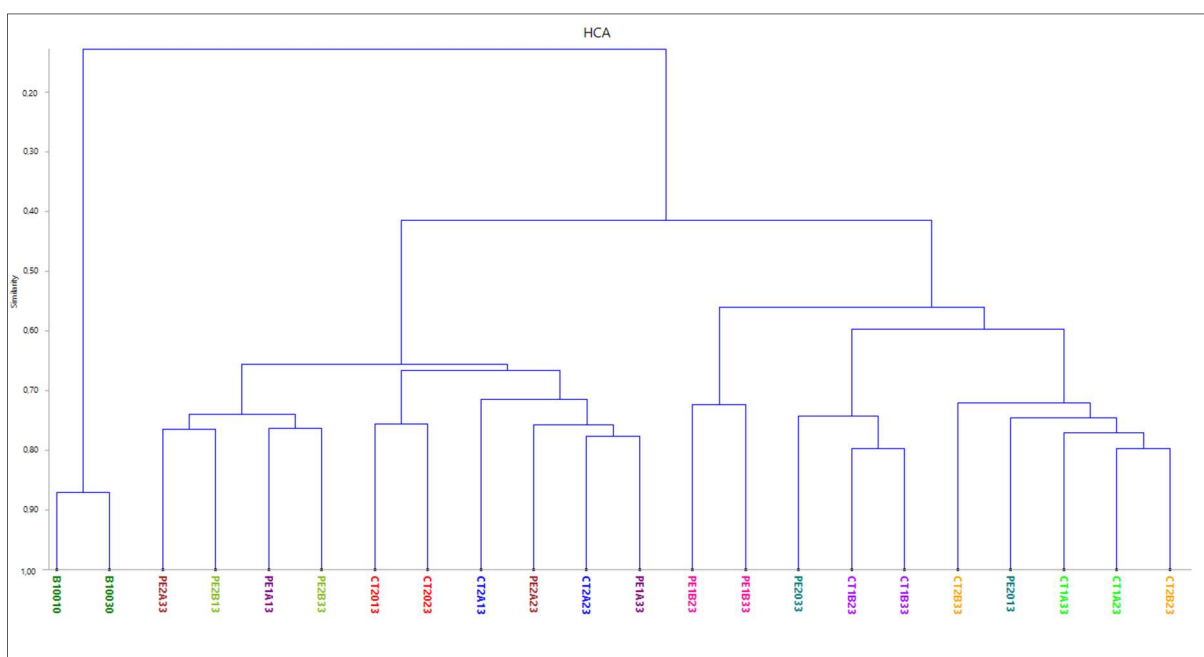


Figura 14 - Agrupamento hierárquico (HCA) dos dados espectrais referentes aos tratamentos Controle (CT) e com o fungo *P. simplicissimum* (PE) nos tempos inicial (B100) e aos 30 dias (200 ppm – 20; 2.000 ppm Água – 2A; 2.000 ppm BH – 2B; 100.000 ppm Água – 1A; 100.000 ppm BH – 1B).

Estudos envolvendo fungos filamentosos e leveduriformes e seus respectivos crescimentos utilizando combustíveis como fontes de carbono são bem estabelecidos na literatura, no entanto, os resultados encontrados neste estudo trazem informações quanto ao desenvolvimento em teores de água e suportes minerais diferentes. Como pôde ser observado, maiores teores de água e a presença de N, P e K impulsionaram o crescimento do fungo filamentosos *P. simplicissimum*, porém quantidades de água menores, quase imperceptíveis, também favoreceram o desenvolvimento de biomassa às expensas do biodiesel.

Yamada-Onodera et al. (2002) observaram a taxa de degradação de 26% a 51% de alcanos de cadeia longa, provenientes de óleo combustível, pelo fungo *P. simplicissimum* (cepa YK). Outros estudos revelaram o potencial do fungo *P. simplicissimum* de produzir enzimas relacionadas à degradação de biodiesel. A lipase produzida por um isolado dessa espécie foi caracterizada como sendo inespecífica, pois hidrolisaria cada uma das três ligações do triacilglicerol (Sztajer et al., 1992). Gutarra et al. (2009) observaram a produção de lipase pelo fungo *P. simplicissimum* utilizando torta de babaçu suplementada com melaço de cana-de-açúcar como

indutores e obtiveram enzimas capazes de hidrolisar todos os ésteres de p-nitrofenil testados (C4:0 – C18:0), mostrando maior atividade em substratos com ésteres graxos de cadeia média.

Sendo assim, pode-se concluir que o crescimento apresentado pelo fungo *P. simplicissimum* em biodiesel nas condições aplicadas a este estudo sugere a alta adaptabilidade desse organismo ao substrato e aos mais variados teores de água. Os resultados observados por infravermelho após 30 dias de contato desse fungo no biodiesel também apontam para a grande capacidade de degradação de ésteres de ácidos graxos por esse isolado.

6.6 CONCLUSÕES

Foi observada a influência do teor de água sobre o crescimento de microrganismos e a estabilidade química do biodiesel durante o armazenamento simulado. Altos teores de água favoreceram o crescimento microbiano, no entanto, biomassas quase imperceptíveis foram observadas em teores de 200 ppm de água. O armazenamento simulado durante 30 dias provocou a absorção de água pelo biodiesel, retirando-o das especificações previstas em lei. O aporte nutricional contido nos teores de água maiores foi responsável por selecionar a comunidade fúngica a se desenvolver às expensas do biodiesel. Maiores tempos de incubação poderiam provocar maiores danos de origem biológica às cadeias carbônicas do biodiesel por essa comunidade microbiana.

O fungo filamentoso *P. simplicissimum* beneficiou-se das condições avaliadas, produzindo biomassa em todos os tratamentos e provocando alterações na estrutura dos ésteres do biodiesel ao final de 30 dias. Os resultados observados neste trabalho indicam haver grande influência do teor de água na estabilidade química e microbiológica do biodiesel durante o armazenamento, sendo necessário uma maior atenção às condições durante a estocagem desse biocombustível, puro e nas proporções cada vez mais crescentes utilizadas em diesel de petróleo, demandada pela indústria.

6.7 AGRADECIMENTOS

Ao LAB-BIO/UFRGS, ao Instituto de Química da UFRGS, ao CNPq e CAPES pelas bolsas concedidas, e à Usina de Biodiesel 3 Tentos.

6.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Associação Brasileira de Normas Técnicas (2014). NBR 15512: Biodiesel — Armazenamento, transporte, abastecimento e controle de qualidade de biodiesel e/ou óleo diesel BX. Rio de Janeiro.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2012, 11 de maio). Resolução ANP nº 14. *Diário Oficial da União*. Recuperado em 09 de janeiro de 2019, de <http://www.anp.gov.br>.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2014, 25 de agosto). Resolução ANP nº 45. *Diário Oficial da União*. Recuperado em 08 de janeiro de 2019, de <http://www.anp.gov.br>.
- Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2018). *Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis*. Rio de Janeiro: ANP.
- Allsopp, D., Seal, K., Gaylarde, C., Bento, F. M., Shirakawa, M., & Saad, D. S. (2016) *Introdução à biodeterioração*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- American Society for Testing and Materials. (2016). ASTM D6304-16e1: Standard Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fischer Titration. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- American Society for Testing and Materials. (2018). ASTM E1259-18: Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390 °C. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- Azambuja, A. O., Bücker, F., de Quadros, P. D., Zhalnina, K., Dias, R., Vacaro, B. B. et al. (2008). M. Microbial community composition in Brazilian stored diesel fuel of varying sulfur content, using high-throughput sequencing. *Fuel*, 189, 340-349.
- Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous

- fungi. *FEMS microbiology reviews*, 32(3), 501-521.
- Bento, F. M. (2001). *Biocorrosão do aço ASTM A283-93 em sistemas diesel água e o efeito de um biocida*. Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia Metalúrgica e dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Bento, F. M., Beech, I. B., Gaylarde, C. C., Englert, G. E., & Muller, I. L. (2005). Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 21(2), 135-142.
- Bento, F. M., Peralba, M. C. R., Ferrão, M. F., Zimmer, A. R., Azambuja, A. O., Barbosa, C. S. et al. (2016). Diagnóstico, Monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento. In Pinho, D. M. M., & Suarez, P. A. Z. (Orgs.), *Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle*. (1a. ed.). Brasília: CDT, UNB.
- Boddy, L. (2015). Genetics–Variation, Sexuality, and Evolution. In Watkinson, S. C., Boddy, L., & Money, N. P. *The Fungi* (3a ed, Cap. 4, pp. 99-139). Cambridge, MA: Academic Press.
- Boelter, G., Cazarolli, J. C., Beker, S. A., de Quadros, P. D., Correa, C., Ferrão, M. F. (2018). *Pseudallescheria boydii* and *Meyerozyma guilliermondii*: behavior of deteriorogenic fungi during simulated storage of diesel, biodiesel, and B10 blend in Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(30), 30410-30424.
- Borneman, J., & Hartin, R. J. (2000). PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(10), 4356-4360.
- Bücker, F., Barbosa, C. S., Quadros, P. D., Bueno, M. K., Fiori, P., te Huang, C. et al. (2014). Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 346-355.
- Bücker, F., Santestevan, N. A., Roesch, L. F., Jacques, R. J. S., Peralba, M. C. R., Camargo, F. A. O. et al. (2011). Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 65, 172–178.
- Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The utilization of hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.*, 41, 653-673.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K. et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community

- sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). Fungal Diversity. In Watkinson, S. C., Boddy, L., & Money, N. P. *The Fungi* (Cap. 1). Cambridge, MA: Academic Press.
- Cazarolli, J. C., Boelter, G., de Lima, A. M., Hengles, T., Correa, C., Peralba, M. C. et al. (2018). Nature of insoluble material found in the bottom of soybean biodiesel storage tank: chemical and microbiological approach. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(10), 2034-2045.
- Cazarolli, J. C., de Quadros, P. D., Bücke, F., Santiago, M. R. F., Piatnicki, C. M. S., Peralba, M. D. et al. (2016). Microbial growth in Acrocomia aculeata pulp oil, Jatropha curcas oil, and their respective biodiesels under simulated storage conditions. *Biofuel Research Journal*, 3(4), 514-520.
- Chaineau, C. H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E., Oudot, J. (1999). Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 227(2-3), 237-247.
- Chandran, P., & Das, N. (2011). Degradation of diesel oil by immobilized *Candida tropicalis* and biofilm formed on gravels. *Biodegradation*, 22(6), 1181-1189.
- Chen, S. H., & Ting, A. S. Y. (2015). Biosorption and biodegradation potential of triphenylmethane dyes by newly discovered *Penicillium simplicissimum* isolated from indoor wastewater sample. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 1-7.
- Ching, T. H., Yoza, B. A., Wang, R., Masutani, S., Donachie, S., Hihara, L. et al. (2016). Biodegradation of biodiesel and microbiologically induced corrosion of 1018 steel by *Moniliella wahieum* Y12. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 122-126.
- Dodos, G. S., Konstantakos, T., Longinos, S., & Zannikos, F. (2012). Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. *Global NEST Journal*, 14(2), 175-182.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*, 10(10), 996.
- European Standard. (2016). *EN 14112: Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test)*.

- Czech Republic: European Standard.
- International Organization for Standardization. (2000). *ISO 12937: Petroleum products - Determination of water - Coulometric Karl Fischer titration method*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Fregolente, P. B. L., Fregolente, L. V., & Maciel, M. R. W. (2012). Water content in biodiesel, diesel, and biodiesel–diesel blends. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 57(6), 1817-1821.
- Gaylarde, C. C., Bento, F. M., & Kelley, J. (1999). Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Revista de microbiologia*, 30(1), 01-10.
- Geary, B. (2016, April). Field Investigation of Biodiesel Fuel Particulate and Moisture Content. *Annual NCUR Conference*, Asheville, North Carolina, US, 30.
- Gianfreda, L., & Rao, M. A. (2017). Soil Microbial and Enzymatic Diversity as Affected by the Presence of Xenobiotics. In Hashmi, M. Z., Kumar, V., & Ajit Varma, A. (Eds.). *Xenobiotics in the Soil Environment* (pp. 153-159). Springer.
- BP Global. (2018). BP Statistical Review of World Energy. June 2018. 67th ed. BP Global.
- Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A. et al. (2017). 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of biotechnology*, 261, 169-176.
- Gutarra, M. L., Godoy, M. G., Maugeri, F., Rodrigues, M. I., Freire, D. M., & Castilho, L. R. (2009). Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource technology*, 100(21), 5249-5254.
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 9(3), 177.
- Hill, E. C., Hill, G. C. (2008). Microbial Contamination and Associated Corrosion in Fuels, During Storage, Distribution and Use. *Advanced Materials Research*, 38, 257-268.
- Hill, E. C., & Hill, G. C. (2009, October). Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesels. In: International Conference on Stability, handling and use of liquid fuels, Prague, Czech Republic, 11.
- Hill, G., O'Malley, L., & Williams, G. (2017, September). Investigation of the influence

- of water content and fatty acid methyl ester (FAME) concentration of susceptibility to and spatial distribution of microbial contamination in biodiesel blends. *International Biodeterioration and Biodegradation Symposium*, Manchester, UK, 17.
- Hoekman, S. K., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., & Natarajan, M. (2012). Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and sustainable energy reviews*, 16(1), 143-169.
- Edenhofer, O., R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. et al. (Eds.). *IPCC 2014: Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Jagtap, U. B., & Bapat, V. A. (2017). Transgenic Approaches for Building Plant Armor and Weaponry to Combat Xenobiotic Pollutants: Current Trends and Future Prospects. In Hashmi, M. Z., Kumar, V., & Ajit Varma, A. (Eds.). *Xenobiotics in the Soil Environment* (pp. 197-215). Springer.
- Jakeria, M. R., Fazal, M. A., & Haseeb, A. S. M. A. (2014). Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 30, 154-163.
- Karavalakis, G., & Stournas, S. (2010). Impact of antioxidant additives on the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. *Energy & Fuels*, 24(6), 3682-3686.
- Knothe, G. (2006). Analyzing biodiesel: standards and other methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(10), 823-833.
- Knothe, G., & Razon, L. F. (2017). Biodiesel fuels. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 58, 36-59.
- Kocamemi, B. A., & Cecen, F. (2010). Biological removal of the xenobiotic trichloroethylene (TCE) through cometabolism in nitrifying systems. *Bioresource technology*, 101(1), 430-433.
- Leff, J. W., Jones, S. E., Prober, S. M., Barberán, A., Borer, E. T., Firn, J. L. et al. (2015). Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 10967-10972.
- Levetin, E., Horner, W. E., & Scott, J. A. (2016). Taxonomy of allergenic fungi. *The*

- Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 4(3), 375-385.
- Lôbo, I. P., Ferreira, S. L. C., & Cruz, R. S. D. (2009). Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quim. Nova*, 32(6), 1596-1608.
- Mallo, A. C., Nitiu, D. S., Elíades, L., & Saparrat, M. (2017). Fungal degradation of cellulosic materials used as support for cultural heritage. *International Journal of Conservation Science*, 8(4), 619-632.
- Mariano, A. P., Tomasella, R. C., De Oliveira, L. M., Contiero, J., & De Angelis, D. D. F. (2008). Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechnology*, 7(9), 1323-1328.
- Meneghetti, S. P., Meneghetti, M. R., & Brito, Y. C. (2013). A Reação de Transesterificação, Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel. *Rev. Virt. Quím.*, 5(1), 63-73.
- Ministério de Minas e Energias. (2018). *Balanço Energético Nacional 2018: Relatório Síntese 2017*. Rio de Janeiro: EPE.
- Passman, F. J. (2013). Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980—a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 88-104.
- Passman, F., & Dobranick, J. K. (2005, September). Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. *Proceedings of the International Conference in Stability, Handling, and Use of Liquid Fuels*, Sitges, Spain, 9.
- Pinho, D. M. M., Suarez, P. A. Z., Meneghetti, S. M. P., & Rangel, E. T. (2016). Problemas de formação de borras durante a estocagem verificados após a obrigatoriedade do biodiesel e as possíveis causas. In Pinho, D. M. M., & Suarez, P. A. Z. (Orgs.), *Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle*. (1a. ed.). Brasília: CDT, UNB.
- Pinto, A. C., Guarieiro, L. L., Rezende, M. J., Ribeiro, N. M., Torres, E. A., Lopes, W. A. et al. (2005). Biodiesel: an overview. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(6B), 1313-1330.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P. et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.*, 41(D1), D590-D596.
- Renewable Energy Policy Network for the 21st Century. *Renewables 2018 Global Status Report*. (2018). Paris: REN21 Secretariat.
- Siegert, W. (2013, January). Microbial contamination in diesel fuel - are new problems

- arising from biodiesel blends? *Proceedings of the International Colloquium - Fuels: Conventional and Future Energy for Automobiles*, Stuttgart/Ostfildern, Germany, 9.
- Soriano, A. U., Martins, L. F., Ventura, E. S. A., de Landa, F. H. T. G., Valoni, E. A., Faria, F. R. D. et al. (2015). Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 99, 102-114.
- Sowmya, H. V., Krishnappa, M., & Thippeswamy, B. (2015). Degradation of polyethylene by *Penicillium simplicissimum* isolated from local dumpsite of Shivamogga district. *Environment, development and sustainability*, 17(4), 731-745.
- Srivastava, N. K., & Nandan, N. K. (2012). Microbial Growth Control in Diesel by Optimization of Sulphur. *International Journal of Environmental Pollution and Remediation (IJEPR)*, 1(1), 119-125.
- Srivastava, N., Gupta, B., Gupta, S., Danquah, M. K., & Sarethy, I. P. (2019). Analyzing Functional microbial diversity: an overview of techniques. In Das, S., & Dash, H. (Eds.). *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 79-102). Academic Press.
- Sztajer, H., Lünsdorf, H., Erdmann, H., Menge, U., & Schmid, R. (1992). Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1124(3), 253-261.
- Tedersoo, L., Tooming-Klunderud, A., & Anslan, S. (2018). PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases and perspectives. *New Phytologist*, 217(3), 1370-1385.
- Vieira, J. A. V., Portilho, B. D., & Lima, M. S. (2007, novembro). Remoção e Reabsorção de Água em Biodiesel de Mamona & Soja. *Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel*, Brasília, DF, 2.
- Yamada-Onodera, K., Mukumoto, H., Katsuyama, Y., & Tani, Y. (2002). Degradation of long-chain alkanes by a polyethylene-degrading fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(6), 828-831.
- Yang, Z., Hollebone, B. P., Wang, Z., Yang, C., & Landriault, M. (2013). Factors affecting oxidation stability of commercially available biodiesel products. *Fuel Processing Technology*, 106, 366-375.
- Ye, C., Ching, T. H., Yoza, B. A., Masutani, S., & Li, Q. X. (2017). Cometabolic degradation of blended biodiesel by *Moniliella wahieum* Y12 T and *Byssochlamys*

- nivea M1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125, 166-169.
- Zehra, A., Dubey, M. K., Meena, M., Aamir, M., Patel, C. B., & Upadhyay, R. S. (2018). Role of Penicillium Species in Bioremediation Processes. In Gupta, V. (Ed.). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 247-260). Elsevier.
- Zhang, Y., Liu, Y., Dong, H., Li, X., & Zhang, D. (2016). The nonylphenol biodegradation study by estuary sediment-derived fungus *Penicillium simplicissimum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 15122-15132.
- Zimmer, A. R., Oliboni, A., Viscardi, S. L., Teixeira, R. M., Ferrão, M. F., & Bento, F. M. (2017). Biodiesel blend (B10) treated with a multifunctional additive (biocide) under simulated stored conditions: a field and lab scale monitoring. *Biofuel Research Journal*, 4(2), 627-636.
- Zimmer, A., Cazarolli, J., Teixeira, R. M., Viscardi, S. L. C., Cavalcanti, E. S. H., Gerbase, A. E. et al. (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.

7 PUBLICAÇÃO 4: EFEITO ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS VEGETAIS E COMPOSTOS SINTÉTICOS SOBRE UMA COMUNIDADE MICROBIANA DETERIOGÊNICA DE BIODIESEL

Juciana Clarice Cazarolli^a, Mariane Rodrigues Lobato^a, Thais Livramento Silva^a, Jhonata Rodrigues de Brito^a, Caroline Borges Agustini^e, Luisa Helena Cazarolli^b, Larissa Canhadas Bertan^b, Maria do Carmo Ruaro Peralba^c, Aline Silva Muniz^d, Maria Aparecida Ferreira César-Oliveira^d, Mariliz Gutterres^e, Jorge Otávio Trierweiler^f, Luciane Ferreira Trierweiler^f, Fátima Menezes Bento^a.

^a Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis (LABBIO), Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, N° 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul, BR 158, km 405, caixa postal 106, CEP: 85301970, Laranjeiras do Sul, PR, Brasil.

^c Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, N° 9500, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

^d Laboratório de Química de Polímeros e Síntese orgânica – LEQUIPE. Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, CP 19032, CEP 81531-980. Curitiba, PR, Brasil.

^e Laboratório de Estudos de Couro e Meio Ambiente - LACOURO, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. R. Eng. Luiz Englert, s/n - Farroupilha, CEP:90040-040, Porto Alegre, RS, Brasil.

^f Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. R. Eng. Luiz Englert, s/n - Farroupilha, CEP:90040-040, Porto Alegre, RS, Brasil.

7.1 HIGHLIGHTS

Os compostos naturais avaliados não apresentaram capacidade bioestática ou biocida sobre os microrganismos presentes no inóculo não caracterizado.

As modificações químicas dos ésteres do biodiesel, com propriedades antioxidantes e/ou anticongelantes, não foram capazes de controlar o crescimento microbiano na presença de biodiesel.

O óleo de pirólise de casca de arroz apresentou ação biocida após 15 dias de contato com o inóculo não caracterizado em um sistema bifásico, com biodiesel e meio mínimo mineral.

7.2 RESUMO

A estabilidade do biodiesel e de suas misturas com diesel à degradação durante o armazenamento tem sido considerada em estudos desde a introdução do biocombustível na matriz energética brasileira. Além de reações de natureza hidrolítica e oxidativa, os quais contribuem para alterações nas propriedades do biodiesel, o desenvolvimento microbiano durante o armazenamento pode resultar na formação de polímeros solúveis e insolúveis, sob a forma de depósitos e borras, que geram entupimentos e perdas durante a estocagem do combustível. Algumas medidas podem ser tomadas para aumentar a resistência do biodiesel à degradação oxidativa e ao crescimento microbiano. O uso de aditivos é amplamente estudado e muitas moléculas com capacidade de aumentar o tempo de prateleira do biodiesel e de sua mistura com diesel já foram identificadas. Com o intuito de observar o potencial antimicrobiano de aditivos de origem natural e sintética, foram realizados testes quanto ao desempenho desses produtos para eliminar uma população microbiana autóctone do sistema de estocagem de biodiesel. Foram avaliados 12 produtos naturais e 4 produtos sintéticos, sendo que não foi observada atividade antimicrobiana, nem inibitória, tampouco biocida em nenhum dos produtos testados. Apenas um deles foi capaz de eliminar a população microbiana após 15 dias de incubação, no entanto a concentração excedeu o limite imposto pela Resolução ANP nº. 45, de 2014, (5.000 ppm) para o uso em biodiesel.

7.3 INTRODUÇÃO

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel é um combustível composto por alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, os quais são produzidos a partir de um processo conhecido como transesterificação e/ou esterificação, e cujas matérias primas podem ser material graxo, de gorduras de origem vegetal ou animal (ANP, 2014). No Brasil, por meio da lei nº. 11.097, de 2005, o biodiesel vem sendo adicionado ao diesel de petróleo, de forma mandatória.

De acordo com a ANP, atualmente existem dois tipos de óleo diesel comercializados no país, o óleo diesel marítimo e o rodoviário. O óleo diesel rodoviário

é classificado como tipo A (sem adição de biodiesel) ou tipo B (com adição de biodiesel) (ANP, 2013). Atualmente, a proporção de biodiesel no diesel comercializado no território brasileiro é de 10%, denominado B10, e a perspectiva no cenário nacional é que esse percentual aumente nos próximos anos.

A produção de biodiesel ocorre pela reação de um ácido graxo com um álcool, geralmente de cadeia curta (metílico ou etílico), denominada de transesterificação (Lôbo et al., 2009). A fonte de ácido graxo mais utilizada no território brasileiro como matéria prima para a reação de transesterificação é a soja, além dela, outras matérias primas também são utilizadas, estando entre elas o óleo de algodão, a gordura animal e os óleos residuais (Knothe et al., 2006; ANP, 2018).

Cada matéria prima tem um perfil de ácidos graxos diferente, transferindo ao biocombustível produzido características intrínsecas a elas, ou seja, as propriedades e atributos dos combustíveis estão intimamente ligadas à sua composição química (Lôbo et al., 2009; Pinho et al., 2016; Ramos et al., 2017). Um perfil de ácidos graxos saturados tende a apresentar incoerências durante a exposição do biodiesel a temperaturas baixas (Banković-Ilić et al., 2014). Quanto maiores e mais saturadas as moléculas do ácido graxo, maior o número de cetanos e a cristalização durante a exposição ao frio, a qual diminui a sua fluidez, dificultando a combustão do combustível (Banković-Ilić et al., 2014; Vargas et al., 2017). Por outro lado, ésteres saturados são mais resistentes à oxidação, demonstrando maior estabilidade durante o armazenamento (Kumar, 2017).

Entre as matérias primas utilizadas como precursoras para a produção de biodiesel, as gorduras animais acabam despertando um grande interesse devido ao seu baixo custo de obtenção. Sebo bovino, gordura de frango, banha de porco e óleo de peixe podem ser utilizados como fonte de material graxo da reação de transesterificação. Estes são considerados resíduos industriais e não uma fonte renovável de energia, além de serem subprodutos com custo relativamente baixo quando comparado a oleaginosas como a soja, por exemplo, as quais demandam tratamento e destinação correta (Moura, Silva & Souza, 2007; Meneghetti, Meneghetti & Brito, 2013; Banković-Ilić et al., 2014). O sebo é constituído por triacilglicerídeos que tem na sua composição, predominantemente, os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e oleico (C18:1) (Moura, Silva & Souza, 2007; Meneghetti, Meneghetti & Brito, 2013). No estado do Rio Grande do Sul, o biodiesel puro B100 pode apresentar,

dependendo da estação do ano, diferentes proporções quanto à origem do biocombustível, soja e sebo (Soares et al., 2014).

O biodiesel somente é liberado para o mercado após passar por algumas análises especificadas pela Resolução ANP nº. 45, de 2014. Entre as análises exigidas estão: o teor de éster, a viscosidade cinemática a 40 °C, a massa específica a 20 °C, o teor de água, o índice de acidez, a estabilidade à oxidação a 110 °C, etc. Alguns parâmetros também são utilizados para avaliar o comportamento desses biocombustíveis em regiões de clima mais frio, entre eles Ponto de névoa (*cloud point*), Ponto de fluidez (*pour point*) e Ponto de entupimento de filtro a frio (*cold filter plugging point*) (Moser, 2013).

Com o intuito de contornar problemas relacionados à solidificação do biodiesel em climas frios, a utilização de aditivos químicos é amplamente indicada. Alguns aditivos melhoram as propriedades de fluidez a baixas temperaturas e, mesmo tendo sido desenvolvidos para o uso em combustíveis fósseis, apresentam eficácia também em combustíveis alternativos à base de gordura animal. Aqueles também têm seu limite de aplicação em biodiesel fixado em resolução, a qual exige que não se ultrapasse 5.000 ppm (Liu, 2015; ANP, 2014).

Por ser composto por ésteres de ácidos graxos, o biodiesel possui maior degradabilidade do que o diesel, cujos constituintes são basicamente hidrocarbonetos de cadeias longas e, comparativamente, pode ser de mais difícil degradação no ambiente (Pinto et al., 2005; Mariano et al., 2008). Essa propriedade é considerada uma das vantagens de se adicionar biodiesel ao diesel em relação a contaminação ambiental. Porém, ela pode ser uma desvantagem quando analisada pelo ponto de vista da armazenagem, visto que normalmente há microrganismos presentes no combustível e a nova formulação do combustível diesel, agora com uma porcentagem de biodiesel, torna o sistema mais suscetível à contaminação microbiana (Passmann et al., 2005; Dodos et al., 2012; Zimmer et al., 2013; Bücken et al., 2014). Uma vez estabelecida uma condição favorável e iniciado o crescimento microbiano, é observado o surgimento de uma massa biológica (lodo) no tanque de estocagem (Gaylarde et al., 1999; Van Hamme et al., 2003; Meneghetti, Meneghetti & Brito, 2013; Bücken et al., 2014).

Procedimentos como drenagens frequentes e limpeza dos tanques de armazenamento podem ser uma forma preventiva de controlar o crescimento

microbiano e evitar o comprometimento da qualidade final do produto armazenado (Gaylarde et al., 1999; Bücken et al., 2011; Bento et al., 2016). Como alternativa, o uso de produtos químicos sintéticos, puros ou em formulações com outras moléculas, denominados pacotes multifuncionais, é amplamente incentivado (Passman, 2013). No entanto, pouco se sabe sobre a influência que o uso de produtos aditivos, responsáveis pelo melhoramento de propriedades dos combustíveis quando em situações desfavoráveis durante o armazenamento, possui sobre a comunidade microbiana presente naturalmente no sistema de estocagem. Neste contexto, este trabalho visa avaliar a ação antimicrobiana de compostos melhoradores de propriedades como anticongelantes e antioxidantes com potencial de uso em biodiesel, diesel e suas misturas frente a comunidades microbianas autóctones do sistema de armazenamento de combustíveis.

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

7.4.1 Pesquisa Bibliográfica

Uma busca na base de dados Web of Science (<https://clarivate.com/products/web-of-science/>), que disponibiliza acesso a mais de 9.200 títulos de periódicos, foi realizada com o intuito de identificar artigos e trabalhos acadêmicos cujo foco principal é o uso de aditivos em diesel e biodiesel. A base de dados utilizada foi a Principal Coleção do Web of Science e foram utilizados, inicialmente, os termos “diesel” ou “biodiesel” (como título) e, posteriormente, os termos “additive” e “natural” foram adicionados como tentativa de selecionar, entre os resultados, trabalhos cujo foco poderia ser aditivos de origem natural.

7.4.2 Compostos avaliados

As avaliações descritas a seguir foram um esforço conjunto entre as Universidades Federais do Rio Grande do Sul (UFRGS), da Fronteira Sul (UFFS) e do Paraná (UFP), totalizando 16 compostos, entre extratos naturais e produtos sintéticos, relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação dos compostos testados.

Produto testado pelo LABBIO	Estado Físico	Fabricação/Marca Comercial
Erva-mate (P) (folhas)	Pó	Fabricação própria
Erva-mate (folha e galhos)	Pó	Erva-mate Laranjeiras
Jabuticaba (Casca da fruta)	Pó	Heide – Extratos vegetais
Alho (bulbo)	Pó	Active Farmacêutica
Limoneno	Líquido	Citrosuco
PA18HQ	Líquido	Fabricação própria
1MB3	Líquido	Fabricação própria
3MB3	Líquido	Fabricação própria
6MB3	Líquido	Fabricação própria
Tanino Quebracho	Pó	Silva Team
Tanino Castanheiro	Pó	Silva Team
Tanfood	Pó	TANAC
Tara Powder	Pó	Silva Team
Óleo de pirólise de eucalipto pelo método convencional (folhas)	Líquido	Fabricação própria
Óleo de pirólise de eucalipto por microondas (folhas)	Líquido	Fabricação própria
Óleo de pirólise de casca de arroz	Líquido	Fabricação própria

7.4.3 Seleção de Aditivos com Propriedades Antimicrobianas

Com o intuito de observar o potencial antimicrobiano dos aditivos selecionados foram conduzidos ensaios para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima biocida (CMB), em frascos de vidro esterilizados com 20 mL de capacidade (Figura 1).

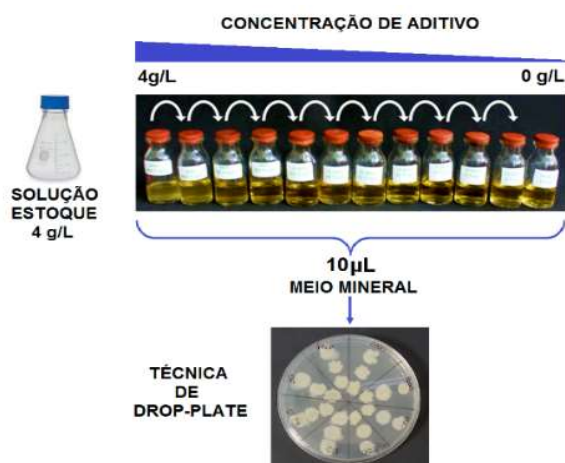


Figura 1 - Esquema ilustrativo sobre as diluições dos aditivos e avaliação da viabilidade microbiana (técnica de drop-plate) na determinação das CMI e CMB.

Os ensaios foram realizados de duas formas: com caldo de cultivo (meio rico em nutrientes LB – Luria Bertani) e na condição simulada com biodiesel e meio mínimo mineral. A forma de avaliação escolhida para cada aditivo foi dependente da solubilidade em biodiesel, quando não solúvel a ação antimicrobiana foi avaliada pelo meio de cultivo caldo LB.

7.4.3.1 Determinação da CMI e CMB

Soluções estoque de 12 a 4 g L⁻¹ (12.000 a 4.000 ppm) de cada aditivo em caldo LB – Luria Bertani (Himedia) – foram preparadas e então realizadas diluições sucessivas, a partir das quais concentrações entre 6 e 0,250 g L⁻¹ foram avaliadas. Um frasco contendo apenas caldo LB sem aditivos foi considerado a condição controle. Após as diluições foi adicionada a cada frasco uma alíquota de um inóculo não caracterizado na concentração de 10⁵ células mL⁻¹, preparado de acordo com a norma ASTM E1259-18 adaptada para biodiesel. As análises foram realizadas durante 15 dias por meio da determinação da CIM, que foi realizada visualmente tendo-se como critério a formação de biomassa/turbidez do meio LB. A determinação da CMB (concentração capaz de promover a inviabilidade celular e/ou dos esporos) foi realizada inoculando, em cada tempo amostral, uma alíquota do meio LB em placas de petri contendo meio de cultura para Contagem Celular (PCA) e meio de cultura para fungos Ágar Batata-Dextrose (BDA). Subsequentemente, as placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 24 h.

Para a avaliação em meio mineral e biodiesel, foram preparadas soluções estoque de 12 a 4 g L⁻¹ de cada aditivo em biodiesel de soja puro (B100) e então realizada uma diluição sucessiva, a partir das quais concentrações entre 6 e 0,250 g L⁻¹ foram avaliadas. Da mesma forma, um frasco contendo 6 mL de biodiesel sem os aditivos foi considerado a condição controle. Após as diluições foi adicionado a cada frasco 1,5 mL de meio mínimo mineral contendo um inóculo não caracterizado na concentração de 10⁵ células mL⁻¹, preparado de acordo com a norma ASTM E1259-18 adaptada para biodiesel. As análises para a determinação da CIM e da CMB foram realizadas da mesma maneira que a descrita anteriormente para o meio LB.

A biomassa formada pelos microrganismos presentes no inóculo ASTM na presença dos aditivos foi avaliada ao final dos 15 dias por meio do método

gravimétrico, pelo qual ela foi filtrada em um sistema a vácuo em discos de papel filtro previamente pesados (Marca J. Prolab, gramatura 80, espessura 205 μm , porosidade 14 μm). Os discos contendo a biomassa foram colocados em estufa a 30 °C durante 4 dias para secagem e após mantidos durante 24 h em dessecador. Após esse período, foram pesados em uma balança de precisão (Marca Marte, modelo AL200C). Para o cálculo da biomassa produzida os valores iniciais foram subtraídos dos pesos finais das membranas.

7.4.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com os dados da biomassa recuperada dos frascos ao final do experimento foram estatisticamente analisados com auxílio do software BioEstat Versão 5.0 (AnalystSoft). Análises de variância e Teste de Dunnet ao nível de 5% de significância foram realizados com o intuito de comparar os resultados obtidos para cada concentração de aditivo quanto ao controle, sem aditivo.

7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca na base de dados Web of Science possibilitou identificar artigos acadêmicos cujos assuntos fossem diesel e biodiesel com foco em uso de aditivos e aditivos naturais. Correlacionando os termos “diesel” ou “biodiesel” (como título) observou-se que a plataforma apresentou um total de 38.539 publicações no período entre 1945 e 2019. A partir desses dados a pesquisa foi refeita, inserindo então o termo “additive”. Os resultados gerados foram de 1.768 publicações, as quais representam 4,5% do total de trabalhos identificados inicialmente. Quando o termo “natural” foi adicionado, os resultados diminuíram mais de 90%, sendo 136 trabalhos acadêmicos encontrados com foco em trabalhos com aditivos naturais para uso em diesel e biodiesel. Baseando-se nesses resultados pôde-se concluir que ainda há muito a ser explorado no campo de aditivos provenientes de fontes renováveis.

Um produto considerado ideal com capacidade antimicrobiana para uso em combustíveis possui algumas características específicas, tais como: ter amplo espectro de ação antimicrobiana (eliminar fungos e bactérias), não ser corrosivo,

manter o seu efeito na presença de outras substâncias, ser biodegradável e ter baixo custo (Gaylarde et al., 1999; Yemanshova et al., 2007; Zimmer et al., 2011; Passman, 2013).

Dos 16 produtos testados nas condições pré-determinadas, 9 foram testados na condição com biodiesel e meio mineral pelo critério de solubilidade em biodiesel. Essa avaliação é uma tentativa de simular as condições de estocagem, com a microbiota presente em contato com o combustível e o aditivo. Os demais, os quais não puderam ser diluídos no biodiesel, foram avaliados com meio de cultura rico em nutrientes, condição ótima para o crescimento microbiano.

Os resultados observados para a concentração mínima inibitória e para a concentração mínima biocida para os compostos aditivos testados neste trabalho estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Pôde-se observar que às 4 h de incubação a maioria dos produtos testados apresentou crescimento microbiano na maior concentração avaliada (2.000 ppm), turvando o meio LB ou o meio mínimo mineral, com exceção das amostras contendo Óleos de pirólise, Limoneno, PA18HQ e PA12A18HQ. Para todos os produtos testados após 24 h de incubação, foi observado crescimento em todas as concentrações testadas. Não foi possível determinar a CMI para os quatro taninos testados pois estes já demonstraram uma turbidez no momento da diluição sucessiva. Sendo assim, seguiu-se apenas com a CMB para a avaliação desses compostos.

Tabela 2 - Valores da Concentração Mínima Inibitória dos compostos testados com um inóculo não caracterizado (ASTM E1259-18).

Produtos	Concentração Mínima Inibitória (CMI)						
	4 h	10 h	24 h	72 h	120 h	240 h	360 h
Erva-mate (P)	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Erva-mate	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Jaboticaba	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Alho	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Limoneno	1000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
PA18HQ	1000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
PA12A18HQ	1000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
1MB3	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
6MB3	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Tanino Quebracho	-	-	-	-	-	-	-
Tanino Castanheiro	-	-	-	-	-	-	-
Tanfood	-	-	-	-	-	-	-

Tara Powder	-	-	-	-	-	-	-
Óleo de pirólise de eucalipto (convencional)	<750	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000
Óleo de pirólise de eucalipto (microondas)	<750	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000
Óleo de pirólise de casca de arroz (convencional)	<750	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000

Tabela 3 - Valores da Concentração Mínima Biocida dos compostos testados com um inóculo não caracterizado (ASTM E1259).

Produtos	Concentração Mínima Biocida (CMB)						
	4 h	10 h	24 h	72 h	120 h	240 h	360 h
Erva-mate (P)	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Erva-mate	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Jabuticaba	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Alho	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Limoneno	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
PA18HQ	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
PA12A18HQ	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
1MB3	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
6MB3	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Tanino Quebracho	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Tanino Castanheiro	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Tanfood	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Tara Powder	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Óleo de pirólise de eucalipto (convencional)	<750	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000
Óleo de pirólise de eucalipto (microondas)	<750	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000
Óleo de pirólise de casca de arroz (convencional)	<750	>6000	>6000	>6000	>6000	6000	6000

Para a maioria dos compostos duas diluições foram testadas, sendo que alguns aditivos, por disponibilidade de material, puderam ser testados em diluições mais concentradas (4.000 a 6.000 ppm). Os resultados observados na Tabela 3 indicam não haver ação antimicrobiana dos produtos testados sobre os microrganismos presentes no inóculo ASTM.

Apenas para o composto proveniente de óleo de pirólise de casca de arroz foi possível observar a morte celular a partir dos 10 dias de contato do aditivo com a comunidade microbiana avaliada. Esse composto apresentou efetividade em controlar a contaminação microbiana quando utilizado na concentração de 6.000 ppm. Apesar de ter tido resultados positivos, o uso desse óleo como um aditivo de biodiesel, da

forma como se apresenta, estaria descartado pois é visto que seu espectro de ação está acima do limite preconizado pela legislação (5.000 ppm - Resolução ANP nº. 45, de 2014).

Após 14 dias, os valores de peso seco relativos ao crescimento microbiano foram obtidos por filtração e estão apresentados na Figura 2. Os resultados para cada produto, e respectiva concentração, sugerem que a presença da maioria dos aditivos estimulou o crescimento microbiano, sendo que os maiores valores de biomassas foram observados nas concentrações mais altas aplicada. Alguns trabalhos confirmam o potencial antimicrobiano de diversos compostos fenólicos cujos modos de ação envolvem a desnaturação de proteínas e a alteração da permeabilidade celular com comprometimento da membrana plasmática (Park et al., 2001; Almeida, 2007; Daglia, 2012; Chaaban et al., 2018).

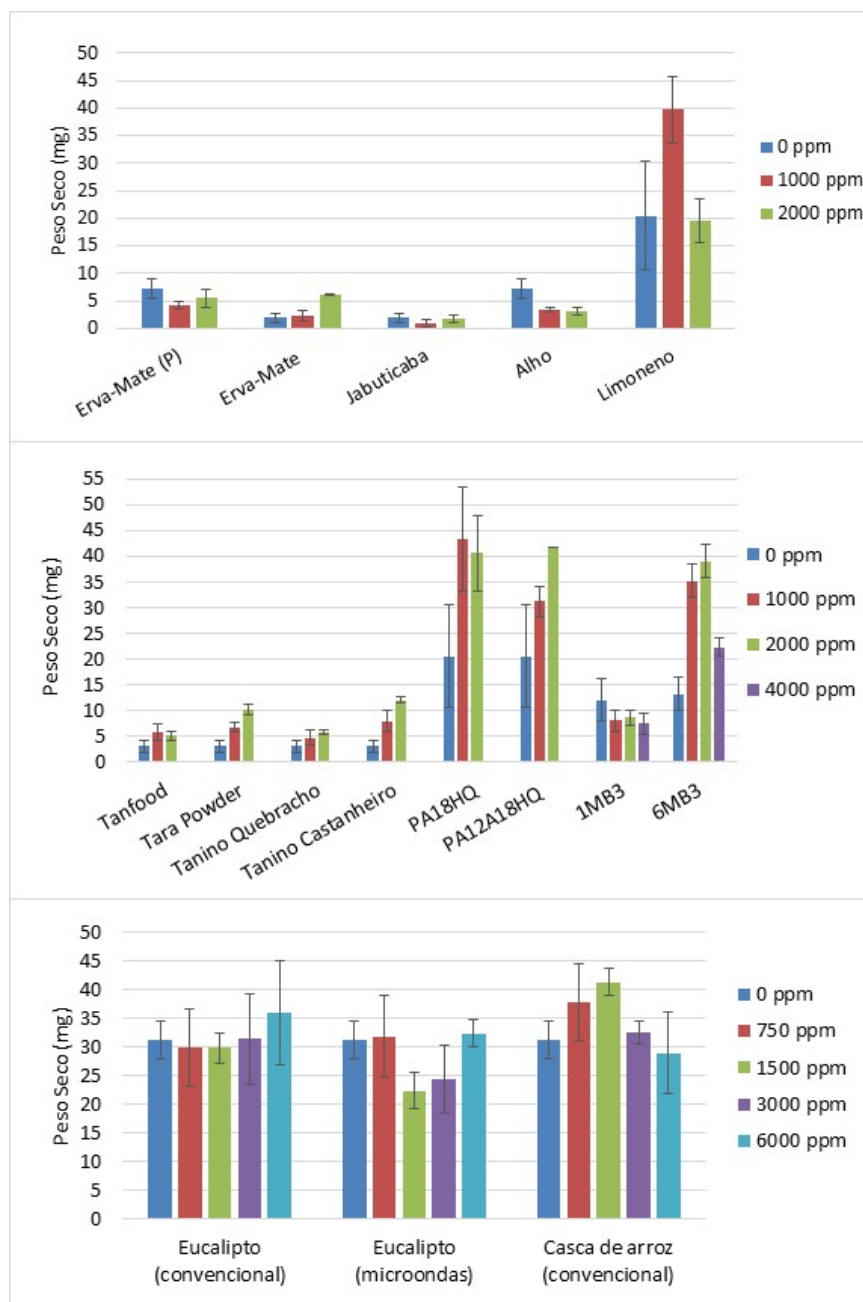


Figura 2 - Valores de biomassa recuperada dos frascos após 15 dias de incubação com os compostos testados.

O potencial de uso de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) como antioxidantes e antimicrobianos já é bem discutido pela literatura (Burriss et al., 2012; Martin et al., 2013). O potencial antioxidante deve-se à composição dos extratos dessa planta, a qual inclui uma variedade de polifenóis, xantinas, derivados de cafeoil, saponinas e minerais (Burriss et al., 2012). O potencial antimicrobiano foi avaliado utilizando microrganismos considerados patógenos alimentares. Os extratos alcóolicos de erva-mate apresentaram atividade contra cepas de *Staphylococcus*

aureus ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 07644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e *Escherichia coli* ATCC 25922 (Martin et al., 2013). Os autores identificaram polifenóis na erva-mate como responsáveis pela ação antimicrobiana. Exemplos de polifenóis que podem ser encontrados nos extratos de erva-mate incluem ácido caféico, cafeína, derivados de cafeoiló, ácido cafeoilchiquímico, ácido clorogênico, ácido feruloilquínico, kaempferol, quercetina, ácido quínico, rutina e teobromina (Burriss et al., 2012). Nossos resultados mostraram que a presença dos extratos de erva-mate promoveu o crescimento microbiano, servindo como um aporte de nutrientes, pois foi verificada uma maior biomassa nos frascos contendo 2.000 ppm de erva-mate ($6,10 \pm 0,20$ mg) ($P < 0,05$). No entanto, para as demais concentrações e para a erva-mate (fabricação própria – p) os valores obtidos não diferiram do controle ($P > 0,05$).

Para o extrato de jabuticaba, a biomassa recuperada dos frascos não se alterou quando comparada ao controle ($P > 0,05$). Autores já identificaram que extratos dessa planta possuem altos teores de compostos fenólicos (Araújo et al., 2013). No entanto, quando frente à comunidade microbiana autóctone de biodiesel, esses não foram efetivos em controlar o crescimento microbiano.

O extrato de alho demonstrou redução estatística nos valores de biomassa recuperados nos tratamentos aos quais foi aplicado, quando comparado com o controle sem aditivos. O uso de alho é historicamente conhecido e suas atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiprotozoários já foram exploradas (Harris et al., 2001; Milani et al., 2016; Felix et al., 2018). A efetividade de extratos de alho no controle do crescimento de cepas ATCC foi testada e a capacidade antimicrobiana de *Allium sativum* foi relacionada à variação do tipo de extrato, da concentração aplicada e do tipo de microrganismo (Felix et al., 2018). Outros autores determinaram, a partir de vários métodos de extração, que o extrato etanólico de alho exibiu as propriedades mais antimicrobianas, sendo o composto alicina responsabilizado pelos resultados observados (Cavallito & Bailey, 1944).

Em nossos resultados foi observado um aumento na biomassa do tratamento com 1.000 ppm ($P < 0,05$), sugerindo que concentrações menores que 1.000 ppm podem ter servido como a fonte de nutrientes/carbono que promoveu o crescimento dos microrganismos presentes no inóculo. Quando a dose utilizada foi duplicada para 2.000 ppm, a biomassa recuperada dos frascos chegou a se equiparar

com a condição controle (0 ppm) ($P > 0.05$).

O limoneno é um terpeno monocíclico formado por duas unidades de isopreno (Ciriminna et al., 2014). Produzido na natureza como um metabólito secundário de plantas, esse composto é alvo de variados estudos que viabilizam seu uso como um aditivo de biodiesel (Mack et al., 2014; Mewalal et al., 2017; Micheli et al., 2018). A biomassa recuperada dos frascos contendo 1.000 ppm de limoneno foi maior que o crescimento detectado para os frascos controle ($P < 0,05$), sendo que com 2.000 ppm igualaram a biomassa recuperada ao tratamento sem o aditivo, controle (condição sem aditivo ($P > 0,05$)). A degradação de limoneno e consequente uso de sua estrutura como fonte de carbono para o crescimento microbiano é extensivamente explorada pela literatura. As biotransformações de D-limoneno por leveduras e fungos parecem ser iniciadas por enzimas denominadas monoxigenases (mediadas pelo citocromo P-450) (Duetz et al., 2003; Marmulla & Harder, 2014). Além disso, vários estudos indicam que as enzimas responsáveis pelas rotas de degradação do limoneno, podem ser constitutivas, fazendo com que mais microrganismos possam reconhecer e degradar terpenos naturalmente (Duetz et al., 2003). Desta forma, esse composto não apresentou potencial como aditivo antimicrobiano para uso em biodiesel.

Com base nos resultados apresentados, não foi observada atividade antimicrobiana dos taninos vegetais, alvos deste estudo, nas concentrações, nos tempos e nas condições avaliadas. Taninos são metabólitos secundários de plantas. Eles são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico e apresentam solubilidade em água e são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais (Monteiro et al., 2005). São amplamente usados na indústria do couro, na qual, juntamente com o cromo, são considerados reagentes de bronzeamento, responsáveis pela fase de curtimento do couro (Agustini et al., 2018; Prigione et al., 2018). Com sua composição basicamente fenólica, os taninos possuem alto potencial antimicrobiano, sendo que a concentração de taninos superior a 0,2 g L⁻¹ poderia inibir fortemente a atividade microbiana, enquanto 2 g L⁻¹ de taninos cessariam completamente a atividade microbiana (Agustini et al., 2018). Provavelmente, o mecanismo de ação estaria ligado a ligações de hidrogênio realizadas entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas, fazendo com que ocorra a desnaturação de proteínas (Monteiro et al., 2005; Daglia,

2012). No entanto, o crescimento de microrganismos, autóctones de um sistema de estocagem de biodiesel, na presença de taninos foi determinado na Figura 2.

Para os taninos de Castanheiro e Tanfood, quanto maior a concentração aplicada, maior o crescimento microbiano em comparação com o tratamento controle ($P < 0,05$). Esses resultados podem estar relacionados à capacidade da comunidade microbiana não caracterizada em produzir, entre outras enzimas, a enzima tanino acil hidrolase. Conhecida como tanase (E.C: 3.1.1.20), essa enzima é produzida por fungos, bactérias e leveduras e é responsável por hidrolisar ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, gerando glicose e ácido gálico, os quais são fontes de carbono facilmente assimiláveis (Macedo et al., 2005; Prigione et al., 2018).

Outra abordagem a ser utilizada consiste em modificações químicas nos próprios ésteres do biodiesel, as quais vêm chamando a atenção quanto ao potencial de uso como aditivos e que, junto ao biodiesel, teriam capacidade de controlar o crescimento de alguns microrganismos (Oliveira et al., 2017; Costa et al., 2018). O aditivo 1MB3 (Octadecanoato de metila-9-catecol) e o 6MB3 (Octadecanoato de metila-9-hidroquinona; derivado de biodiesel de canola puro) foram preparados a partir de ésteres de ácidos graxos, com a adição dos grupamentos catecol e hidroquinona, respectivamente (Muniz-Wypych, 2016). Pôde-se observar que doses menores que 4.000 ppm do aditivo 6MB3 foram responsáveis por induzir a formação de biomassa pela comunidade microbiana ($P < 0,05$). A partir de 4.000 ppm a biomassa recuperada foi igual a do controle ($P > 0,05$). O aditivo 1MB3 não apresentou diferenças entre as doses aplicadas e o tratamento controle ($P > 0,05$).

Elementos como o catecol são compostos fenólicos resultantes da degradação no ambiente de hidrocarbonetos aromáticos e lignina por microrganismos e o potencial antimicrobiano destes tem sido extensamente estudado (Schweigert et al., 2001; Amato et al., 2018). Os catecóis possuem potenciais antioxidantes e pró-oxidantes, sendo que esse último danificaria moléculas como o DNA e proteínas. Devido à sua atividade de ciclagem redox, eles também podem afetar o funcionamento da membrana plasmática (desnaturação proteica e alteração da permeabilidade) de células microbianas (Schweigert et al., 2001; Dodos et al., 2017). Dodos et al. (2017) observaram a ação antioxidante e antimicrobiana de 10 aditivos sintéticos e naturais, sendo que entre os naturais, compostos com derivados de pirocatecol, MCT (metil catecol) e TBC (tert-butil catecol) provaram ser eficientes em

inibir o crescimento microbiano da bactéria *Bacillus stearothermophilus* em biodiesel, semelhante ao comportamento observado para os aditivos sintéticos TBHQ e propilgalato (PG). No entanto, tal atividade não foi observada nas condições aplicadas em nosso estudo, durante o cultivo de microrganismos presentes no inóculo ASTM na presença de aditivos contendo esse grupamento.

Os aditivos PA18HQ (poli[acrilato de oleíla]) e PA12A18HQ (poli[acrilato de dodecila-co-acrilato de oleíla-co-acrilato de estearila]) foram sintetizados a partir da homopolimerização de monômeros acrílicos com a adição de hidroquinona (Muniz-Wypych, 2016). Para ambos aditivos, foram observados aumentos nos valores recuperados de peso seco quando comparados aos controles, não apresentando diferenças entre as doses aplicadas ($P > 0,05$).

O TBHQ (terc-butil hidroquinona), aditivo antioxidante disponível comercialmente e amplamente recomendado, possui em sua composição o grupamento hidroquinona e já apresentou atividade antimicrobiana contra microrganismos isolados provenientes de tanques de estocagem de diesel e biodiesel (Jain & Sharma, 2010; Beker et al., 2016a; Kleinberg et al., 2017). Beker et al. (2016a) observaram o efeito antimicrobiano do aditivo TBHQ nas concentrações de 250 ppm, 500 ppm e 1.000 ppm no crescimento de *B. pumilus*, *P. boydii* e *C. guilliermondii* e *P. variotii*, respectivamente. No entanto, frente à comunidade microbiana presente em um inóculo ASTM o TBHQ não apresentou efetividade em controlar ou inibir o crescimento dos microrganismos.

Outros trabalhos apresentaram a abordagem de modificações dos ésteres do biodiesel a fim de evitar algumas desvantagens durante o seu armazenamento. A hidroformilação de ésteres de ácidos graxos foi o recurso utilizado por Ramalho et al. (2016). Esta consiste na adição de um grupo formil ($H-C=O$) às ligações duplas presentes nos ésteres do biodiesel. Os autores observaram que, a partir de 5% de mistura dos ésteres modificados no biodiesel, a atividade antimicrobiana foi detectada para todos os fungos testados. Para todas as bactérias alvo, essa proporção foi de 10%. Além disso, a redução de 25% de biomassa formada pelo isolado *A. fumigatus* foi observada aos 28 dias de incubação na mistura de ésteres modificados com biodiesel de 5%.

Os valores de biomassa recuperados dos frascos dos tratamentos com óleo de pirólise, em todas as concentrações utilizadas, não diferiram dos controles,

estatisticamente ($P > 0,05$). A aparência da biomassa avaliada por microscopia óptica é apresentada na Figura 3. O tratamento com óleo de pirólise de casca de arroz na concentração de 6.000 ppm foi responsável pela morte celular de fungos e bactérias, sendo observada após 15 dias de contato do inóculo com o aditivo diluído em biodiesel. Pôde-se observar a ausência de hifas no tratamento com casca de arroz a 6.000 ppm após os 15 dias de incubação, quando comparados aos demais óleos de pirólise preparados a partir de biomassa de eucalipto, o que confirma que os componentes presentes naquele óleo de pirólise possuem potencial esporostático e esporicida sobre os fungos observados no inóculo ASTM.

A pirólise realizada a partir de biomassa vegetal é geralmente definida como a sua decomposição na ausência de ar à pressão atmosférica, em temperaturas entre 450 e 550 °C, a qual produz bio-óleo líquido, biocarvão sólido e produtos de gás não condensável. Outros nomes para o bio-óleo líquido são óleo de pirólise ou somente bio-óleo (Qi et al., 2007; Kan et al., 2016).

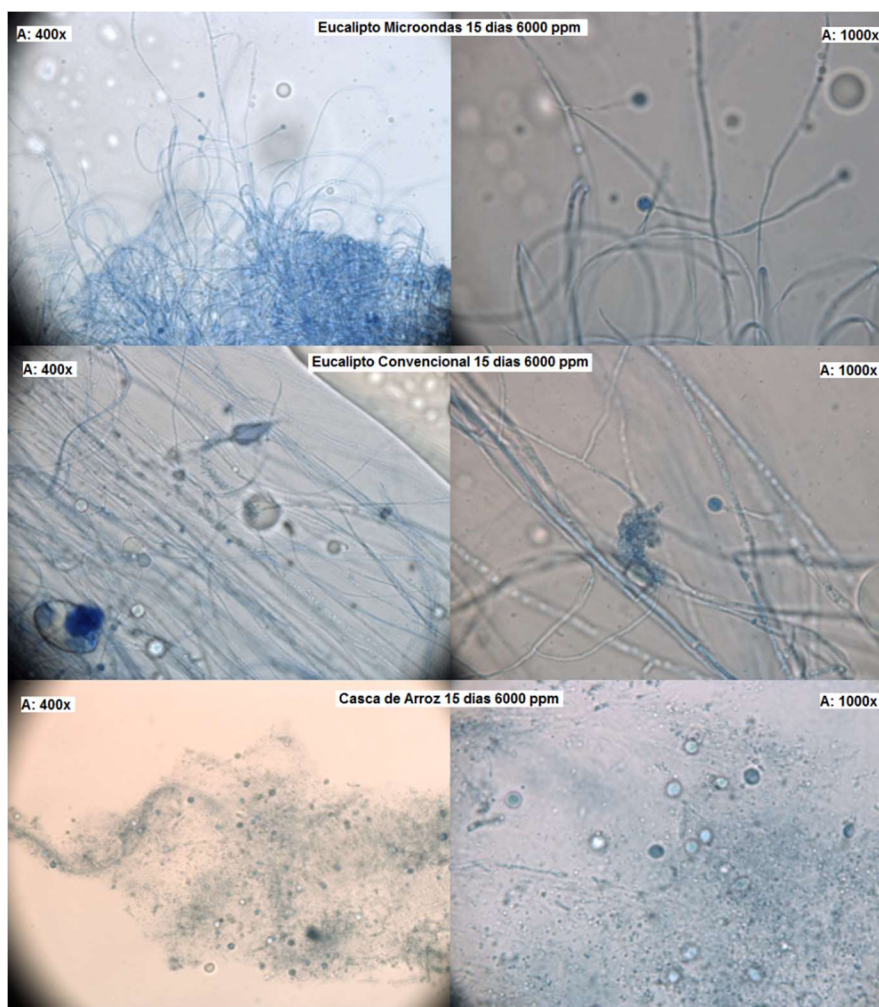


Figura 3 - Microscopia óptica da biomassa detectada para os tratamentos com óleos de pirólise, na concentração mais alta aplicada após 15 dias de incubação. Coloração com Azul de Lactofenol e Aumentos de 400x e 1.000x (imersão).

Os bio-óleos são misturas de diferentes moléculas derivadas da fragmentação da celulose, hemicelulose e lignina, sendo assim, a composição desses difere de combustíveis derivados do petróleo e biodiesel, por exemplo (Qi et al., 2007). A composição dos óleos de pirólise é dependente do tipo de biomassa utilizada como matéria prima. O bio-óleo produzido a partir da casca de arroz é semelhante a outros bio-óleos quanto à sua composição química, sendo constituída basicamente de água, alcanos, cetonas, ácidos carboxílicos, aldeídos, ésteres, compostos nitrogenados, compostos aromáticos, álcoois e éteres (Qiang et al., 2018).

A avaliação de um bio-óleo como um antimicrobiano foi realizada por Beker et al. (2016b). Os autores observaram o potencial de ação antimicrobiana de um bio-óleo produzido a partir de óleo de soja, grãos de café e serragem de eucalipto quanto ao uso como um antimicrobiano aplicado à mistura de diesel B10 de 0 a 10%. Foi

observado o controle do crescimento dos fungos *Paecilomyces variotii* e *Candida silvicola* com 4% de bio-óleo adicionado ao diesel. Para a bactéria *Bacillus pumilus* esse valor foi de 1%. Quando um inóculo não caracterizado foi utilizado, esse não apresentou crescimento a partir de 0,25%. Esses resultados sugerem que o óleo de pirólise possui capacidade de inibir o crescimento de vários tipos de microrganismos. Beker et al. (2016b) observaram a presença de vários compostos fenólicos no meio de cultura utilizado como fonte de nutrientes para o crescimento microbiano e conferiram a esses compostos a atividade observada.

O extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) apresenta compostos fenólicos, carnosol, ácido carnósico e ácido rosmarínico. Aquele tem alto poder antioxidante e foi avaliado, ao ser aplicado em biodiesel, quanto à sua capacidade antioxidante e antimicrobiana (Ribeiro et al., 2016; Beker et al., 2016c). Beker et al. (2016c), avaliando o mesmo extrato contra microrganismos isolados de combustíveis, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida guilliermondii*, *Paecilomyces variotii* e um inóculo não-caracterizado (Norma ASTM 1259) em meio de cultura, não observaram efeito antimicrobiano em concentrações de 1.000 mg kg⁻¹.

Moléculas sintéticas, conhecidas como biocidas, são compostos orgânicos e inorgânicos com alto potencial de desinfecção, comumente utilizados para remoção de microrganismos de um ambiente (Bautista et al., 2016). Os biocidas são utilizados nos Estados unidos e na Europa como uma forma de preservação dos combustíveis (Gaylarde et al., 1999; Passman, 2013; Zimmer et al., 2017). Os grupos químicos indicados como biocidas são isotiazolonas, carbamatos, tiocarbamatos, organoboranas, oxazolidinas, hexahidrotiazinas, aldeídos, imidazóis, fenóis, morfolina e tiocianatos (Gaylarde et al., 1999; Passman, 2003; Passman, 2013; Bautista et al., 2016; Zimmer et al., 2017). No Brasil, com a adição mandatória de biodiesel ao diesel por meio da lei nº. 11.097, de 2005, observou-se um maior desenvolvimento microbiano durante o armazenamento, sendo cada vez mais necessários, conforme a proporção de biodiesel aumenta, métodos de controle da comunidade microbiana presente em tanques de estocagem. No entanto, biocidas sintéticos ainda não possuem regulamentação de uso nos combustíveis brasileiros com essa intenção.

Por serem produtos tóxicos, recomendam-se mais estudos e cautela no uso desses agentes, sendo que é altamente necessário selecionar o produto a ser

utilizado de acordo com algumas propriedades importantes, químicas e ambientais (Gaylarde et al., 1999). Estes produtos não podem alterar as especificações dos combustíveis nem ter efeitos negativos em bombas ou canos, não podem emitir poluentes durante a queima do combustível tratado com eles, devem ser seguros, fáceis de gerenciar e armazenar, devem ter capacidade de manter o seu efeito inibidor na presença de outras substâncias no meio e de apresentar propriedades de biodegradabilidade, bem como devem ser compatíveis com o combustível, isto é, devem ser solúveis em ambas as fases orgânica (combustível) e aquosa, para igual tratamento (Gaylarde et al., 1999; Passman, 2000; Yemanshova et al., 2007; Passman, 2013; Bento et al., 2016; Bautista et al., 2016). Um biocida pode aumentar ainda mais o dano ambiental no caso de um derrame acidental caso não atenda a essas necessidades.

Neste sentido, um agente com dupla aplicação como antioxidante e antimicrobiano seria de interesse na indústria de combustíveis, já que contribuiria para reduzir a quantidade total de aditivos químicos utilizados. Alguns aditivos sintéticos com propriedades antioxidantes são encontrados comercialmente: BHA (hidroxianisol butilado), BHT (hidroxitolueno butilado), TBHQ (terc-butil hidroquinona), PG (propil galato) e PY (pirogalol) (Dodos et al., 2017). Aditivos e biocidas sintéticos ainda são mais utilizados, pois apresentam melhor desempenho quando comparados aos provenientes de fontes naturais (Sousa et al., 2014; Balaji & Cheralathan, 2015). No entanto, a busca por alternativas menos impactantes vem direcionando as pesquisas para produtos de origem natural, sendo assim, ainda há muito o que ser explorado. Os dados observados neste trabalho orientam quanto ao desempenho dos produtos testados, aditivos de origem natural ou sintética, frente a uma comunidade microbiana diversa e não microrganismos isolados, de acordo com condições ideais e padronizadas, o que pode simular a realidade encontrada em tanques de estocagem de combustíveis.

7.6 CONCLUSÕES

Dezesseis compostos foram avaliados quanto à sua capacidade antimicrobiana frente a um inóculo não caracterizado preparado de acordo com a norma E1259-18. Não foram observadas atividades bioestáticas (inibitórias) em

nenhum dos produtos sobre a comunidade microbiana durante 15 dias de avaliação, nas condições aplicadas. Apenas para o óleo de pirólise produzido a partir de casca de arroz foi observado ação biocida ao final do experimento, na concentração de 6.000 ppm, inviabilizando-o como um aditivo de biodiesel pois excede o limite de aplicação imposto pela Resolução ANP nº. 45, de 2014 (5000 ppm). Os valores de biomassa recuperados dos frascos ao final do experimento sugerem que a presença dos aditivos em baixas concentrações ou subdosagens pode promover um incremento no crescimento microbiano, ao invés de inibi-lo ou eliminá-lo.

7.7 AGRADECIMENTOS

Ao LAB-BIO/UFRGS, ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas, e à usina de biodiesel 3 Tentos.

7.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2013, 24 de dezembro). Resolução ANP nº 50. *Diário Oficial da União*. Recuperado em 10 de janeiro de 2019, de <http://www.anp.gov.br>.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2014, 25 de agosto). Resolução ANP nº 45. *Diário Oficial da União*. Recuperado em 08 de janeiro de 2019, de <http://www.anp.gov.br>.
- Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2018). Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis. Rio de Janeiro: ANP.
- Agustini, C. B., Spier, F., da Costa, M., & Gutterres, M. (2018). Biogas production for anaerobic co-digestion of tannery solid wastes under presence and absence of the tanning agent. *Resources, Conservation and Recycling*, 130, 51-59.
- Almeida, A. A. P. (2007). Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação in vitro e em modelo alimentar. Tese de Doutorado, Programa Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Amato, A., Migneco, L. M., Martinelli, A., Pietrelli, L., Piozzi, A., & Francolini, I. (2018).

- Antimicrobial activity of catechol functionalized-chitosan versus *Staphylococcus epidermidis*. *Carbohydrate polymers*, 179, 273-281.
- American Society for Testing and Materials. (2018). ASTM E1259-18: Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390 °C. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- Araújo, C. R. R., Silva, T. D. M., Lopes, M., Villela, P., Alcântara, A. F. D. C., & Dessimoni-Pinto, N. A. V. (2013). Total antioxidant capacity, total phenolic content and mineral elements in the fruit peel of *Myrciaria cauliflora*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 16(4), 301-309.
- Balaji, G., & Cheralathan, M. (2015). Experimental investigation of antioxidant effect on oxidation stability and emissions in a methyl ester of neem oil fueled DI diesel engine. *Renewable energy*, 74, 910-916.
- Banković-Ilić, I. B., Stojković, I. J., Stamenković, O. S., Veljkovic, V. B., & Hung, Y. T. (2014). Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 238-254.
- Bautista, L. F., Vargas, C., González, N., Molina, M. C., Simarro, R., Salmerón, A. et al. (2016). Assessment of biocides and ultrasound treatment to avoid bacterial growth in diesel fuel. *Fuel Processing Technology*, 152, 56-63.
- Beker, S. A., Cavalcanti, E. H. S., Ribeiro, D. S., Souza, A. L., Queiroz, N., Santos, I. M. G., Bento, F. M. (2016a, novembro). Ação antimicrobiana de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre micro-organismos deteriorogênicos de diesel-biodiesel. *Anais do Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel*, Natal, Rio Grande do Norte, 6.
- Beker, S. A., da Silva, Y. P., Bücker, F., Cazarolli, J. C., de Quadros, P. D., Peralba, M. D. C. R. et al. (2016b). Effect of different concentrations of tert-butylhydroquinone (TBHQ) on microbial growth and chemical stability of soybean biodiesel during simulated storage. *Fuel*, 184, 701-707.
- Beker, S. A., Machado, M. E., Maciel, G. P., Silva, R., Cataluña, R., Caramão, E. B., & Bento, F. M. (2016c). Antimicrobial potential of bio-oil for use in diesel oil B10. *J. Braz. Chem. Soc.*, 27(1), 91-98.
- Bento, F. M., Peralba, M. C. R., Ferrão, M. F., Zimmer, A. R., Azambuja, A. O., Barbosa, C. S. et al. (2016). Diagnóstico, Monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento. In

- Pinho, D. M. M., & Suarez, P. A. Z. (Orgs.), *Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle*. (1a. ed.). Brasília: CDT, UNB.
- Borugadda, V. B., Dalai, A. K., & Ghosh, S. (2018). Effects of natural additives on performance of canola biodiesel and its structurally modified derivatives. *Industrial Crops and Products*, 125, 303-313.
- Bücker, F., Barbosa, C. S., Quadros, P. D., Bueno, M. K., Fiori, P., te Huang, C. et al. (2014). Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 346-355.
- Bücker, F., Santestevan, N. A., Roesch, L. F., Jacques, R. J. S., Peralba, M. C. R., Camargo, F. A. O. et al. (2011). Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 65, 172–178.
- Burris, K. P., Harte, F. M., Davidson, P. M., Stewart Jr, C. N., & Zivanovic, S. (2012). Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): a review. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(2), 268-274.
- Cavallito, C. J., & Bailey, J. H. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of the American Chemical Society*, 66(11), 1950-1951.
- Chaaban, I., El Sayeda, M., El Razik, H. A. A., El Salamouni, N. S., Ghareeb, D. A., Wahab, A. E. A. (2018). Synthesis and evaluation of new phenolic derivatives as antimicrobial and antioxidant agents. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 149(1), 127-139.
- Ciriminna, R., Lomeli-Rodriguez, M., Cara, P. D., Lopez-Sanchez, J. A., & Pagliaro, M. (2014). Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. *Chemical Communications*, 50(97), 15288-15296.
- Costa, K. P., Valle, S. F. D., Dos Santos, T. F., Rangel, E. T., Pinto, A. C., Suarez, P. A. et al. (2018). Synthesis and Evaluation of Biocide and Cetane Number Improver Additives for Biodiesel from Chemical Changes in Triacylglycerides. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(12), 2605-2615.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Dodos, G. S., Konstantakos, T., Longinos, S., & Zannikos, F. (2012). Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. *Global NEST*

- Journal*, 14(2), 175-182.
- Dodos, G. S., Tsesmeli, C. E., & Zannikos, F. (2017). Evaluation of the antimicrobial activity of synthetic and natural phenolic type antioxidants in biodiesel fuel. *Fuel*, 209, 150-161.
- Duetz, W. A., Bouwmeester, H., Van Beilen, J. B., & Witholt, B. (2003). Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(4), 269-277.
- Felix, A. L. M., Medeiros, I. L., & Medeiros, F. D. (2018). Allium Sativum: a new approach to microbial resistance-a review. *Brazilian Journal of Health Review*, 1(1), 201-207.
- Garcia-Perez, M., Adams, T. T., Goodrum, J. W., Das, K. C., & Geller, D. P. (2010). DSC studies to evaluate the impact of bio-oil on cold flow properties and oxidation stability of bio-diesel. *Bioresource technology*, 101(15), 6219-6224.
- Gaylarde, C. C., Bento, F. M., & Kelley, J. (1999). Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Revista de microbiologia*, 30(1), 01-10.
- Guedes, R. E., Luna, A. S., & Torres, A. R. (2018). Operating parameters for bio-oil production in biomass pyrolysis: A review. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 129, 134-149.
- Harris, J. C., Cottrell, S., Plummer, S., & Lloyd, D. (2001). Antimicrobial properties of Allium sativum (garlic). *Applied microbiology and biotechnology*, 57(3), 282-286.
- Jain, S., & Sharma, M. P. (2010). Stability of biodiesel and its blends: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 667-678.
- Kan, T., Strezov, V., & Evans, T. J. (2016). Lignocellulosic biomass pyrolysis: A review of product properties and effects of pyrolysis parameters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57, 1126-1140.
- Kleinberg, M. N., Rios, M. A., Buarque, H. L., Parente, M. M., Cavalcante, C. L., & Luna, F. M. T. (2017). Influence of Synthetic and Natural Antioxidants on the Oxidation Stability of Beef Tallow Before Biodiesel Production. *Waste and Biomass Valorization*, 1, 1-7.
- Knothe, G. (2006). Analyzing biodiesel: standards and other methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(10), 823-833.
- Kumar, N. (2017). Oxidative stability of biodiesel: Causes, effects and prevention. *Fuel*, 190, 328-350.

- Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005.* Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. Recuperado de http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm
- Liu, G. (2015). Development of low-temperature properties on biodiesel fuel: a review. *International Journal of Energy Research*, 39(10), 1295-1310.
- Lôbo, I. P., Ferreira, S. L. C., & Cruz, R. S. D. (2009). Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quim. Nova*, 32(6), 1596-1608.
- Lu, Q., Yang, X. L., & Zhu, X. F. (2008). Analysis on chemical and physical properties of bio-oil pyrolyzed from rice husk. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 82(2), 191-198.
- Macedo, G. A., Matsuda, L. K., & Battestin, V. (2005). Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. *Ciênc. agrotec.*, 29(4), 833-838.
- Mack, J. H., Rapp, V. H., Broeckelmann, M., Lee, T. S., & Dibble, R. W. (2014). Investigation of biofuels from microorganism metabolism for use as anti-knock additives. *Fuel*, 117, 939-943.
- Mariano, A. P., Tomasella, R. C., De Oliveira, L. M., Contiero, J., & De Angelis, D. D. F. (2008). Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechnology*, 7(9), 1323-1328.
- Marmulla, R., & Harder, J. (2014). Microbial monoterpene transformations—a review. *Frontiers in microbiology*, 5, 346.
- Martin, J. G. P., Porto, E., de Alencar, S. M., da Glória, E. M., Corrêa, C. B., & Cabral, I. S. R. (2013). Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. *Revista Argentina de microbiologia*, 45(2), 93-98.
- Meneghetti, S. P., Meneghetti, M. R., & Brito, Y. C. (2013). A Reação de Transesterificação, Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel. *Rev. Virt. Quím.*, 5(1), 63-73.
- Mewalal, R., Rai, D. K., Kainer, D., Chen, F., Külheim, C., Peter, G. F. et al. (2017). Plant-derived terpenes: A feedstock for specialty biofuels. *Trends in biotechnology*, 35(3), 227-240.
- Micheli, L. F., Módolo, D. L., & Pereira, L. E. R. (2018). Effects of the use of D-Limonene as na additive to diesel-biodiesel blends on exhaust gases composition

- of compression ignition engines. *Revista de Engenharia Térmica*, 17(2), 33-36.
- Milani, H. L. A., Teixeira, A. X. V., de Sousa, E. C., de Abreu, V. A., & Ninahuaman, M. F. M. L. (2016). Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do alho (*Allium sativum*) in natura. *Acta Scientiae Biological Research*, 1(1), 47-58.
- Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P., Araujo, E., & Amorim, E. L. C. (2005). Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, 28(5), 892-896.
- Moser, B. R. Biodiesel properties and alternative feedstocks. In Yang, S. T., El-Enshasy, H. A., Thongchul, N. (Eds). *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers* (pp. 205-234). Wiley.
- Moura, K. R. M., Silva, F. C., & Souza, A. (2007). Estabilidade térmica do sebo bovino e do biodiesel metílico e caracterização. *Revista Biodiesel*, 13, 34-36.
- Muniz-Wypych, A. S. (2016). *Desenvolvimento de aditivos bifuncionais de ação antioxidante e anticongelante para biodiesel*. Tese de Doutorado, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- Oliveira, R. S., Machado, P. M. A., Ramalho, H. F., Rangel, E. T., Suarez, P. A. Z. (2017). Acylation of epoxidized soybean biodiesel catalyzed by SnO/Al₂O₃ and evaluation of physical chemical and biologic activity of the product. *Industrial Crops and Products*, 104, 201-209.
- Park, E. S., Moon, W. S., Song, M. J., Kim, M. N., Chung, K. H., & Yoon, J. S. (2001). Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives. *International biodeterioration & biodegradation*, 47(4), 209-214.
- Passman, F. (2000, September). New guides for diagnosing and controlling microbial contamination in fuel and fuel systems. *International Conference in Stability, Handling, and Use of Liquid Fuels* (pp. 24-29), Spain, 7.
- Passman, F. J. (2013). Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980—a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 88-104.
- Passman, F. J. (Ed.) (2003). *Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis, and Contamination Control*. ASTM.
- Passman, F., & Dobranick, J. K. (2005, September). Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. *Proceedings of the International Conference in Stability, Handling, and Use of Liquid Fuels* (pp. 18-22), Sitges, Spain, 9.

- Pinho, D. M. M., Suarez, P. A. Z., Meneghetti, S. M. P., & Rangel, E. T. (2016). Problemas de formação de borras durante a estocagem verificados após a obrigatoriedade do biodiesel e as possíveis causas. In Pinho, D. M. M., & Suarez, P. A. Z. (Orgs.), *Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle*. (1a. ed.). Brasília: CDT, UNB.
- Pinto, A. C., Guarieiro, L. L., Rezende, M. J., Ribeiro, N. M., Torres, E. A., Lopes, W. A. et al. (2005). Biodiesel: an overview. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(6B), 1313-1330.
- Pinto, L. M., de Souza, A. L., Souza, A. G., Santos, I. M., & Queiroz, N. (2015). Comparative evaluation of the effect of antioxidants added into peanut (*Arachis hypogae* L.) oil biodiesel by P-DSC and rancimat. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 120(1), 277-282.
- Prigione, V., Spina, F., Tigini, V., Giovando, S., & Varese, G. C. (2018). Biotransformation of industrial tannins by filamentous fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(24), 10361-10375.
- Ramalho, H. F., Ferreira, K., Machado, P., Silva, T. B., Rangel, E. T., Prauchner, M. J. et al. (2016). Production of additives with antimicrobial activity via tandem hydroformylation-amine condensation of soybean FAME using an ionic liquid-based biphasic catalytic system. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(2), 321-333.
- Ramos, L. P., Kothe, V., César-Oliveira, M. A. F., Muniz-Wypych, A. S., Nakagaki, S., Krieger, N. et al. (2017). Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. *Rev. Virtual Quim*, 9(1), 317-369.
- Ribeiro, D. S., Nobre, T. S., Andrade, F. M. M., Costa, M. F. C., Queiroz, N., Santos, I. M. G. et al. (2016). Extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em composição binária com TBHQ no controle da oxidação do biodiesel de algodão durante estocagem. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1003-1004). Natal.
- Schweigert, N., Zehnder, A. J., & Eggen, R. I. (2001). Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to

- mammals: Minireview. *Environmental microbiology*, 3(2), 81-91.
- Soares, I. P., Laviola, B. G., Schultz, E. L., de Almeida, J. R. M., Favaro, L. D. L., Damaso, M. C. T. et al. (2014). *Biodiesel: desafios e oportunidades. Comunicado Técnico 08*. Brasília, DF: Embrapa.
- Sousa, L. S., de Moura, C. V. R., de Oliveira, J. E., & de Moura, E. M. (2014). Use of natural antioxidants in soybean biodiesel. *Fuel*, 134, 420-428.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4), 503-549.
- Vargas, B. S., Lissner, L. A., & Meth, S. (2017). Características Físico-Químicas do Biodiesel conforme Especificações da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. *Revista da Mostra de Trabalhos de Conclusão de Curso Congrega Urcamp*, 1, 317-327.
- Yemanshova, N. A., Murygina, V. P., Zhukov, D. V., Zakharyantz, A. A., Gladchenko, M. A., Appanna, V. et al. (2007). Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology, Dordrecht*, 6(4), 315-337.
- Zhang, Q., Chang, J., Wang, T., & Xu, Y. (2007). Review of biomass pyrolysis oil properties and upgrading research. *Energy Conversion and Management*, 48(1), 87-92.
- Zimmer, A. R., Oliboni, A., Viscardi, S. L., Teixeira, R. M., Ferrão, M. F., & Bento, F. M. (2017). Biodiesel blend (B10) treated with a multifunctional additive (biocide) under simulated stored conditions: a field and lab scale monitoring. *Biofuel Research Journal*, 4(2), 627-636.
- Zimmer, A., Cazarolli, J., Teixeira, R. M., Viscardi, S. L. C., Cavalcanti, E. S. H., Gerbase, A. E. et al. (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.

8 DISCUSSÃO GERAL

Esta tese foi organizada em quatro seções correspondentes a publicações. Em cada etapa do estudo, procurou-se responder à hipótese de que a comunidade microbiana presente no sedimento formado em tanques de biodiesel apresenta capacidade deteriorogênica, representando fonte de contaminação com risco à cadeia de transporte e distribuição. Nesta seção estão apresentados os principais resultados e são discutidos os aspectos mais relevantes obtidos de cada seção anterior.

No estudo apresentado na seção 4, foi coletado o fundo de um tanque de estocagem, um lodo com um aspecto viscoso, em uma usina produtora de biodiesel. A partir dele, foi preparado um inóculo, de acordo com a norma ASTM E1259-18, o qual foi utilizado nos experimentos realizados nos demais estudos (Seções 6 e 7). Essa borra proveniente da usina de biodiesel foi avaliada quanto à sua composição química, na qual ésteres de ácidos graxos e íons metálicos foram identificados, não sendo detectados esteróis glicosídeos. A literatura tem avaliado sedimentos de origens e formas similares e, particularmente em biodiesel, a composição química é tida como sendo monoglicerídeos saturados, ácidos graxos e esteróis glicosídeos (Bondioli, 2009; Fernandes et al., 2012; Plata et al.; 2015). A ausência de esteróis glicosídeos foi considerada incomum, visto que a presença desses compostos é apontada como a principal causa da formação de sedimentos em tanques de estocagem de biodiesel (Bondioli et al, 2008; Plata et al., 2015).

A comunidade microbiana cultivável presente nesse sedimento foi isolada e identificada, sendo obtidas sete bactérias e cinco fungos filamentosos, dentre os quais foi possível detectar a produção de enzimas envolvidas na degradação dos ésteres de ácidos graxos, como as lipases, apontando um potencial deteriorogênico da comunidade presente na borra. Na tentativa de simular condições mais próximas da realidade e procurando entender o potencial microbiano do lodo ao estar em contato com o biodiesel que seria misturado ao diesel, a borra coletada dos tanques foi utilizada como um inóculo em microcosmos. Após 60 dias de armazenamento simulado, a população microbiana presente na borra coletada não foi capaz de crescer significativamente na presença de biodiesel, o que refletiu nos baixos valores de degradação dos ésteres monitorados por infravermelho.

Durante o experimento de armazenamento simulado com a borra como

inóculo, apresentado na Seção 4, em um dos tratamentos foi utilizado biodiesel proveniente da usina produtora de onde o lodo foi retirado. Esta amostra passou por toda a cadeia de transporte até a distribuidora, sendo utilizado como o tratamento denominado condição de recebido. Nessa condição, foi detectada a presença de uma levedura pertencente ao grupo das leveduras negras, *Aureobasidium pullulans*, identificada molecularmente por sequenciamento da região ITS. Segundo a literatura, esta já havia sido isolada de combustível diesel, mas ainda não tinha sido reportada sua presença em biodiesel (Gaylarde et al., 1999). Neste sentido, o potencial de crescimento e, conseqüentemente, o potencial deteriorogênico em biodiesel por essa levedura foi avaliado.

O estudo apresentado na Seção 5 teve o intuito de descrever o comportamento da levedura *Aureobasidium pullulans* na presença de biodiesel, diesel e mistura B20, por meio de técnicas moleculares e microbiológicas clássicas. Na presença de biodiesel a levedura *A. pullulans* foi capaz de produzir a enzima lipase durante 25 dias de contato com ésteres de ácidos graxos, tendo a presença das células leveduriformes aumentado consideravelmente a quantidade de enzima detectada no meio. Quando comparada a outras cepas de mesma espécie produtoras de lipase, o rendimento observado para a cepa *A. pullulans* LABBIO17 foi reduzido, sendo que outros mecanismos enzimáticos, como o citocromo P450, poderiam estar sendo utilizados para suportar o seu crescimento a partir desta fonte de carbono (Bussamara et al., 2010; Bornscheuer, 2017).

A capacidade de produção de vesículas de óleo na presença de biodiesel pela levedura *A. pullulans* foi comparada com a presença de glicose no meio de crescimento, bem como à outras leveduras também isoladas de combustíveis em trabalhos anteriores. A presença das vesículas em todas as leveduras em biodiesel foi visualizada por microscopia de fluorescência, sendo que quando glicose foi aplicada como fonte de carbono, apenas a levedura *M. guilliermondii* não apresentou corpos lipídicos em seu citoplasma. A produção de gotículas lipídicas ou corpos lipídicos por leveduras é bem explorada pela literatura, tendo o tamanho e quantidade dos corpos lipídicos variado de acordo com a espécie da levedura, o estágio de crescimento dela e as condições ambientais de onde estão (Fakas, 2017; Graef, 2018; Goold et al., 2015; Pyc et al., 2017). A produção de corpos lipídicos pelo gênero *Aureobasidium* já havia sido detectada na presença de glicose, no entanto nossos

resultados indicam que ésteres de ácidos graxos podem servir de indutores da rota metabólica produtora dessas vesículas (Manitchotpisit et al., 2011; Wang et al., 2014; Liu et al., 2014).

O biodiesel também foi responsável por mudanças na estrutura morfológica e da população de leveduras *A. pullulans*. Na presença de diferentes fontes de carbono, com as mesmas condições de temperatura, volume de meio no frasco, velocidade de agitação e tempo de incubação, o aparecimento de uma estrutura de biofilme foi observado na presença de biodiesel. Essa estrutura era formada por hifas, pseudo-hifas e células livres interligadas em uma matriz cristalizada, possivelmente formada por polissacarídeos excretados pela própria levedura e caracterizada por microscopia eletrônica de varredura. O crescimento no meio GYMP consistiu em uma biomassa repleta de células livres, de tamanhos variados, sendo que hifas e pseudo-hifas também estavam presentes. No meio BDA, a levedura não apresentou crescimento expressivo, tendo células isoladas não sido observadas, apenas alguns pontos de crescimento de hifas aderidas à lamínula.

O crescimento visível da levedura em biodiesel foi maior quando comparado à biomassa detectada na mistura com diesel (B20) e no combustível diesel puro (B0). A avaliação por PCR quantitativo do gene 18S rDNA indicou o aumento na contagem do número de cópias de 10^7 número de cópias μL^{-1} para 10^9 número de cópias μL^{-1} em 5 dias para ambas fontes de carbono contendo ésteres de ácidos graxos (B100 e B20). Este aumento resultou na biomassa observada aos 25 dias, bem como nos valores de pH encontrados para a fase aquosa, sendo que o pH do tratamento com diesel puro não apresentou decréscimo relacionado ao crescimento da levedura. Em ambos tratamentos (B100 e B20) foi observada a presença do composto palmitaldeído, que, conforme a literatura, trata-se de um metabólito microbiano (Sims et al., 2004; Singh & Poeta, 2016). Ao final do experimento, uma taxa de degradação de 10% das metilas do grupo éster presentes no biodiesel foi observada na amostra de B100 puro.

O desenvolvimento microbiano às expensas de combustíveis estocados depende de dois importantes fatores: 1) potencial deteriogênico intrínseco ao microrganismo; e 2) presença de umidade/água (Passman, 2013; Bento et al., 2016). O teor de água presente no biodiesel é um parâmetro que está associado à estabilidade química, já que a presença de água durante a estocagem, além de

catalisar reações químicas (hidrólise, por exemplo), estimula o crescimento microbiano, representando riscos para a qualidade do produto final armazenado.

No estudo apresentado na Seção 6 diferentes teores de água presentes no biodiesel foram avaliados quanto ao efeito sobre parâmetros como estabilidade oxidativa e conteúdo de água do combustível durante uma estocagem simulada de 30 dias. A contaminação microbiana consistiu de um fungo filamentososo e a contaminação autóctone, do combustível como recebido da usina com a adição de um inóculo não caracterizado, preparado de acordo com a norma ASTM E1259-18. Ao final dos 30 dias de avaliação foi observado que teores de água mais altos favoreceram o crescimento microbiano. Além disso, foi observado crescimento microbiano em teores de 200 ppm de água dissolvidos no próprio combustível.

O fungo filamentososo apresentou a maior biomassa entre as contaminações microbianas avaliadas. O gênero *Penicillium* é conhecido por seu potencial deteriorogênico, desde alimentos até compostos xenobióticos (Chaîneau et al., 1999; Chen et al., 2015; Zhang et al., 2016; Zehra et al., 2018). O tempo de incubação, os teores de água e o aporte de nutrientes causaram modificações na comunidade fúngica presente no inóculo não caracterizado (tratamento ASTM), as quais foram detectadas por sequenciamento de alto rendimento pela plataforma Illumina Miseq. Uma seleção dos táxons presentes no inóculo inicial foi observada no tratamento ao qual o meio mínimo mineral Bushnell e Haas (1941) foi adicionado como fase aquosa.

Após 30 dias foi observado um acúmulo de água pelo biodiesel, sendo que os maiores teores detectados foram provenientes das amostras às quais adicionou-se uma fase aquosa. Nessas mesmas amostras observou-se um equilíbrio na absorção de água, resultado condizente com a literatura (Fregolente et al., 2012). As presenças de água e microrganismos foram responsáveis por modificações nos ésteres presentes no biodiesel, indicando uma degradação do produto durante a estocagem simulada. Os resultados observados no estudo da Seção 6 reforçam a necessidade de uma maior atenção às condições de estocagem, ao monitoramento da qualidade do combustível e à manutenção preventiva de tanques de estocagem, pois foi observada uma grande influência do teor de água na estabilidade química e microbiológica do biodiesel.

Além do teor de água, outros fatores podem ser responsáveis pela estabilidade do biodiesel durante o armazenamento. O perfil de ácido graxo presente

na matéria prima do biodiesel pode ser responsável por alterar algumas propriedades após a produção. Juntamente à alta suscetibilidade desse combustível ao crescimento microbiano, como relatado nas demais seções, há uma grande tendência à autoxidação e deterioração química durante a estocagem do biocombustível (Pinho et al., 2016; Ramos et al., 2017). Com o intuito de aumentar a vida de prateleira do biodiesel, bem como melhorar suas propriedades frente a temperaturas altas e baixas e condições adversas de estocagem, o uso de aditivos antioxidantes, anticongelantes e biocidas é amplamente incentivado (Passman, 2013).

No estudo apresentado na Seção 7, então, foi observado o potencial de uso de 16 compostos, naturais e sintéticos, quanto à sua capacidade antimicrobiana, frente a um inóculo não caracterizado preparado de acordo com a norma E1259-18. O uso de um aditivo multifuncional, antioxidante ou anticongelante e/ou antimicrobiano, diminuiria a quantidade de produtos químicos adicionados ao combustível estocado. Além disso, por serem normalmente tóxicos, o impacto ambiental gerado pela queima do combustível com esse aditivo seria reduzido. A matéria prima do aditivo, quando oriunda de fonte renovável, também seria importante na redução do impacto do uso desses produtos. No entanto, aditivos químicos sintéticos ainda são mais utilizados pelo rendimento que apresentam frente aos aditivos naturais (Sousa et al., 2014; Balaji & Cheralathan, 2015).

Os resultados descritos naquela seção mostram que entre os produtos testados não foi observada atividade inibitória sobre a comunidade microbiana, nas condições aplicadas durante 15 dias de incubação. O óleo de pirólise produzido a partir de casca de arroz apresentou ação biocida apenas ao final do experimento, porém, a concentração utilizada excede o limite de aplicação desses produtos em biodiesel imposto pela Resolução ANP nº. 45, de 2014 (5000 ppm). Os valores de biomassa recuperados dos frascos ao final do experimento sugeriram que os aditivos podem servir de fonte de nutrientes para a comunidade microbiana presente no inóculo, e, ao invés de controlá-lo, podem induzir o crescimento microbiano.

Nesse sentido, os resultados apresentados por meio dos estudos constituintes desta tese, mesmo que ainda haja muito a ser explorado, auxiliam na compreensão dos mecanismos de contaminação microbiana do biodiesel, bem como dos processos de degradação, os quais envolvem a comunidade microbiana e alguns atributos químicos durante a estocagem.

9 CONCLUSÃO

A partir dos resultados pôde-se concluir que:

1) O lodo coletado de um tanque de estocagem de uma usina produtora de biodiesel foi caracterizado como sendo de origem química, apresentando uma microbiota associada a ele. A microbiota presente nessa borra não foi capaz de, na densidade microbiana apresentada, degradar o biodiesel durante 60 dias. O biodiesel proveniente da cadeia de transporte (de uma distribuidora) e utilizado como recebido apresentou uma comunidade microbiana distinta quando comparada à presente na borra, tendo sido identificada a levedura *Aureobasidium pullulans* como o microrganismo predominante nesse tratamento.

2) A levedura *Aureobasidium pullulans* foi capaz de crescer às expensas de biodiesel e da mistura (B20) com diesel, determinada por peso seco e por PCR quantitativo. Não foi observado crescimento em óleo diesel puro. A capacidade de produção de enzima lipase, corpos lipídicos e possíveis modificações morfológicas causadas pela presença de biodiesel foram observadas. A levedura *A. pullulans* foi capaz de degradar, em 25 dias, 10% dos ésteres de ácidos graxos, sendo caracterizada por infravermelho, e 10% da cadeia hidrofóbica do éster Linolênico, sendo observada por RMN.

3) A influência do teor de água no crescimento de microrganismos e na estabilidade química do biodiesel durante o armazenamento simulado foi observada. Altos teores de água favoreceram o crescimento microbiano, bem como, juntamente com o tempo de avaliação, o aumento da absorção de água pelo biodiesel. O meio mínimo mineral demonstrou alto poder seletivo sobre a comunidade fúngica presente no inóculo não caracterizado preparado de acordo com a norma ASTM E1259-18, tendo a comunidade sido determinada por Sequenciamento de alto rendimento (Illumina MiSeq). A composição majoritária da comunidade fúngica presente no inóculo não caracterizado foi de representantes do Filo Ascomycota. A biodegradação dos ésteres de ácidos graxos foi observada quando a presença do fungo filamentoso *P. simplicissimum* foi relatada, sendo que esse isolado se beneficiou das condições avaliadas. Os resultados observados neste trabalho indicam haver grande influência do teor de água na estabilidade química e microbiológica do biodiesel durante o armazenamento.

4) Dezesesseis compostos de origens sintética e natural com potencial de serem usados como aditivos foram avaliados quanto à sua capacidade antimicrobiana frente a um inóculo não caracterizado preparado de acordo com a norma E1259-18. Atividade inibitória ou biocida não foi detectada em quase nenhum dos produtos, nas condições aplicadas. A exceção foi o óleo de pirólise produzido a partir de casca de arroz, o qual obteve atividade biocida após 15 dias na concentração de 6.000 ppm. No entanto, essa concentração de uso em biodiesel é superior ao máximo exigido pela Resolução ANP nº. 45, de 2014, a qual estabelece o máximo como sendo 5.000 ppm. Os valores de biomassa recuperados dos frascos ao final do experimento sugerem que a presença dos compostos avaliados, sintéticos e naturais, podem induzir o crescimento microbiano, ao invés de inibi-lo ou eliminá-lo.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Abreu, F. R., Alves, M. B., Macêdo, C. C., Zara, L. F., & Suarez, P. A. (2005). New multi-phase catalytic systems based on tin compounds active for vegetable oil transesterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 227(1-2), 263-267.
- Advanced Chemistry Development, Inc., (2015) *ACD/ChemSketch Software 2018.1.1*. Toronto.
- Agarwal, S., Singhal, S., Singh, M., Arora, S., & Tanwer, M. (2018). Role of antioxidants in enhancing oxidation stability of biodiesels. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(8), 11036-11049.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2014, 25 de agosto). Resolução ANP nº 45. *Diário Oficial da União*. Recuperado em 08 de janeiro de 2019, de <http://www.anp.gov.br>.
- Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2018). *Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis*. Rio de Janeiro: ANP.
- Allsopp, D., Seal, K., Gaylarde, C., Bento, F. M., Shirakawa, M., & Saad, D. S. (2016) *Introdução à biodeterioração*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Almeida, V. P., Longhi, G. M., & dos Santos, L. R. (2017). Etanol: 40 anos de evolução do mercado de combustíveis e automóveis no Brasil. *Revista Teoria e Evidência Econômica*, 23(49).
- Ambat, I., Srivastava, V., & Sillanpää, M. (2018). Recent advancement in biodiesel production methodologies using various feedstock: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 356-369.
- Ambrozin, A. R. P., Kuri, S. E., & Monteiro, M. R. (2009). Corrosão metálica associada ao uso de combustíveis minerais e biocombustíveis. *Química Nova*, 32(7), 1910-1916.
- American Society for Testing and Materials. (2018). ASTM E1259-18: Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390 °C. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- Andrade, L. C. T., França, F. R. M., Aranda, D. A., Ramos, A. L. D., & Silva, G. F.

- (2016). Análise da estabilidade oxidativa do biodiesel de soja, utilizando antioxidante produzido a partir da *Moringa oleifera* lam. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1245-1246). Natal.
- Azambuja, A. O., Bücker, F., de Quadros, P. D., Zhalnina, K., Dias, R., Vacaro, B. B. et al. (2008). M. Microbial community composition in Brazilian stored diesel fuel of varying sulfur content, using high-throughput sequencing. *Fuel*, 189, 340-349.
- Baena, T. M. F., Muniz-Wypych, A. S., Oliveira, A. R. S., César-Oliveira, M. A. F. Ésteres poliméricos derivados de anidrido maleico e diferentes comonômeros como aditivos anticongelantes para biodiesel metílico e etílico de soja. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1177-1178). Natal.
- Balaji, G., & Cheralathan, M. (2015). Experimental investigation of antioxidant effect on oxidation stability and emissions in a methyl ester of neem oil fueled DI diesel engine. *Renewable energy*, 74, 910-916.
- Balen, M., Tanobe, V. O. A., & Yamamoto, C. I. (2014, outubro). Aditivos para a melhoria das propriedades de escoamento do biodiesel a frio. In *Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, São Paulo, São Paulo, 20.
- Banković-Ilić, I. B., Stojković, I. J., Stamenković, O. S., Veljković, V. B., & Hung, Y. T. (2014). Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 238-254.
- Bastos, R. R. C., Monteiro Júnior, O. V., Thomaz, K. T. C., Pontes, R. G., Bittencourt, J. A., Conceição, L. R. V. e al. (2013, abril). Comportamento antioxidante de extratos etanólicos na estabilidade oxidativa de biodiesel de soja. In *Anais Congresso Norte-Nordeste de Química e Encontro Norte-Nordeste de Ensino de Química*, Natal, Rio Grande do Norte, 5, 3.
- Beck, Á., Pölczmán, G., Eller, Z., & Hancsók, J. (2014). Investigation of the effect of

- detergent–dispersant additives on the oxidation stability of biodiesel, diesel fuel and their blends. *Biomass and Bioenergy*, 66, 328-336.
- Beker, S. A., Cavalcanti, E. H. S., Ribeiro, D. S., Souza, A. L., Queiroz, N., Santos, I. M. G., Bento, F. M. Ação antimicrobiana de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre micro-organismos deteriogênicos de diesel-biodiesel. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 861-862). Natal.
- Beker, S. A., da Silva, Y. P., Bücken, F., Cazarolli, J. C., de Quadros, P. D., Peralba, M. D. C. R. et al. (2016). Effect of different concentrations of tert-butylhydroquinone (TBHQ) on microbial growth and chemical stability of soybean biodiesel during simulated storage. *Fuel*, 184, 701-707.
- Beker, S. A., Lobato, M. R., Cavalcanti, E. H. S., Silva, E. C., Meneghetti, M. R., Meneghetti, S. M. P. et al. (2016) Ação antimicrobiana de compostos a base de estanho em biodiesel sobre microorganismos deteriogênicos de diesel-biodiesel. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1121-1122). Natal.
- Bento, F. M., Beech, I. B., Gaylarde, C. C., Englert, G. E., & Muller, I. L. (2005). Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 21(2), 135-142.
- Bento, F. M., Gaylarde, C. C. (1996). Microbial contamination of stored diesel oil. Brazilian. *Journal of Microbiology*, 27(3), 71-75.
- Bento, F. M., Peralba, M. C. R., Ferrão, M. F., Zimmer, A. R., Azambuja, A. O., Barbosa, C. S. et al. (2016). Diagnóstico, Monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o armazenamento. In Pinho, D. M. M., & Suarez, P. A. Z. (Orgs.), *Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle*. (1a. ed.). Brasília: CDT, UNB.
- Bento, F. M., Viscardi, S. L. C., Daroda, R., Menendez, A. G., Camargo, F. A. O., &

- Gaylarde, C. C. (2006). Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. *Revista Biodiesel*, 4, 24-26.
- Bezerra, K. D. S., & Antoniosi Filho, N. R. (2015). Análise comparativa do conteúdo em esteróides livres de diferentes óleos, gorduras e biodieseis por cromatografia gasosa. *Quim. Nova*, 38(4), 498-505.
- Bonaroski, G. S., Lanzarini, R. P. S. P., Baena, T. M. F., Muniz-Wypych, A. S., Ramos, L. P., Oliveira, A. R. S. et al. (2016). Aditivos anticongelantes derivados de metacrilato de dodecila, para biodiesel de soja e diesel S10. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel (Vol. 2, pp. 1223-1224)*. Natal.
- Bondioli, P. (2009). Nature of some insoluble materials recovered from biodiesel samples. *Eur. J Lipid. Sci. Tech.*, 111(8), 814-821.
- Bondioli, P., Cortesi, N., & Mariani, C. (2008). Identification and quantification of sterylglucosides in biodiesel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 110(2), 120-126.
- Bornscheuer, U. T. (2018). Enzymes in Lipid Modification. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 85-103.
- Borugadda, V. B., Dalai, A. K., & Ghosh, S. (2018). Effects of natural additives on performance of canola biodiesel and its structurally modified derivatives. *Industrial Crops and Products*, 125, 303-313.
- BP Global. (2018). BP Statistical Review of World Energy. June 2018. 67th ed. BP Global.
- Bruttel, P., & Schlink, R. (2003). Water determination by Karl Fischer titration. *Metrohm Monograph*, 8(5003), 2003-2009.
- Bücker, F., Barbosa, C. S., Quadros, P. D., Bueno, M. K., Fiori, P., te Huang, C. et al. (2014). Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 346-355.
- Bücker, F., de Moura, T. M., da Cunha, M. E., de Quadros, P. D., Beker, S. A., Cazarolli, J. C. et al. (2018). Evaluation of the deteriorogenic microbial community using qPCR, n-alkanes and FAMES biodegradation in diesel, biodiesel and blends

- (B5, B10, and B50) during storage. *Fuel*, 233, 911-917.
- Bücker, F., Santestevan, N. A., Roesch, L. F., Jacques, R. J. S., Peralba, M. C. R., Camargo, F. A. O. et al. (2011). Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 65, 172–178.
- Bussamara, R., Fuentefria, A. M., de Oliveira, E. S., Broetto, L., Simcikova, M., Valente, P. et al. (2010). Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*, 101(1), 268-275.
- Canakci, M., Monyem, A., & Van Gerpen, J. (1999). Accelerated oxidation processes in biodiesel. *Transactions of the ASAE*, 42(6), 1565.
- Carneiro, G. A., Silva, J. J. R., Oliveira, G. A., & Pio, F. P. B. (2018). Uso de Microalgas para Produção de Biodiesel. *Research, Society and Development*, 7(5), 1-12.
- Carrim, A. J. I., Azeredo, W. A., Bezerra, K. S., Oliveira, L. G., Antoniosi Filho, N. R. Avaliação de alguns produtos naturais como antioxidantes para biodiesel metílico de óleos de fritura. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel (Vol. 2, pp. 1265-1266). Natal.
- Castro, A. G. (2013). *Estudo da influência da curcumina na estabilidade oxidativa de biodieseis e óleos vegetais*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Castro, C. N. D. (2011). O programa nacional de produção e uso do biodiesel (PNPB) e a produção de matéria-prima de óleo vegetal no Norte e no Nordeste. *Texto para Discussão*, 1613.
- Cavalcanti, E. H. de S., Zimmer, A. R., Bento, F. M., & Ferrão, M. F. (2019). Chemical and microbial storage stability studies and shelf life determinations of commercial Brazilian biodiesels stored in carbon steel containers in subtropical conditions. *Fuel*, 236, 993-1007.
- Cazarolli, J. C., Boelter, G., de Lima, A. M., Hengles, T., Correa, C., Peralba, M. C. et al. (2018). Nature of insoluble material found in the bottom of soybean biodiesel storage tank: chemical and microbiological approach. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(10), 2034-2045.

- Cazarolli, J. C., Guzatto, R., Samios, D., Peralba, M. D. C. R., Cavalcanti, E. H. D. S., & Bento, F. M. (2014). Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, *95*, 364-372.
- Cazarolli, J. C., Muniz-Wypych, A. S., Lobato, M. R., Costa, M. M., Oliveira, A. R. S., César-Oliveira, M. A. F., Bento, F. M. Modificação química de ésteres graxos insaturados e potencial de aplicação como aditivos antimicrobianos para biodiesel. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel (Vol. 2, pp. 893-894). Natal.
- Chaaban, I., El Sayeda, M., El Razik, H. A. A., El Salamouni, N. S., Ghareeb, D. A., Wahab, A. E. A. (2018). Synthesis and evaluation of new phenolic derivatives as antimicrobial and antioxidant agents. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, *149*(1), 127-139.
- Chaineau, C. H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E., Oudot, J. (1999). Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science of the Total Environment*, *227*(2-3), 237-247.
- Chen, S. H., & Ting, A. S. Y. (2015). Biosorption and biodegradation potential of triphenylmethane dyes by newly discovered *Penicillium simplicissimum* isolated from indoor wastewater sample. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *103*, 1-7.
- Conselho Nacional de Política Energética. (2017, 9 de novembro). Resolução nº 23. Estabelece a adição obrigatória, em volume, de dez por cento de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final. *Diário Oficial da União*. Recuperado em 02 de janeiro de 2019, de <http://www.mme.gov.br/web/guest/conselhos-e-comites/cnpe/cnpe-2017>.
- Costa, K. P., Valle, S. F. D., Dos Santos, T. F., Rangel, E. T., Pinto, A. C., Suarez, P. A. et al. (2018). Synthesis and Evaluation of Biocide and Cetane Number Improver Additives for Biodiesel from Chemical Changes in Triacylglycerides. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *29*(12), 2605-2615.

- Crane, C.R., & Sanders, D. C. (1967). *Evaluation of a biocidal turbine-fuel-additive*. Washington, DC: Federal Aviation Administration, Office of Aerospace Medicine.
- Cruz, Y. R., Aranda, D. A., Seidl, P. R., Diaz, G. C., Carliz, R. G., Fortes, M. M. et al. (2018). Cultivation Systems of Microalgae for the Production of Biofuels. In Biernat, K. (Ed.). *Biofuels-State of Development*. IntechOpen.
- Dabdoub, M. J., Bronzel, J. L., & Rampin, M. A. (2009). Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Química Nova*, 32(3), 776-792.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Damasceno, S. S., Santos, N. A., Santos, I. M., Souza, A. L., Souza, A. G., & Queiroz, N. (2013). Caffeic and ferulic acids: an investigation of the effect of antioxidants on the stability of soybean biodiesel during storage. *Fuel*, 107, 641-646.
- DeMello, J. A., Carmichael, C. A., Peacock, E. E., Nelson, R. K., Arey, J. S., & Reddy, C. M. (2007). Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. *Marine Pollution Bulletin*, 54(7), 894-904.
- Dias, J. M., Araújo, J. M., Costa, J. F., Alvim-Ferraz, M. C. M., & Almeida, M. F. (2013). Biodiesel production from raw castor oil. *Energy*, 53, 58-66.
- Dodos, G. S., Konstantakos, T., Longinos, S., & Zannikos, F. (2012). Effects of microbiological contamination in the quality of biodiesel fuels. *Global NEST Journal*, 14(2), 175-182.
- Dodos, G. S., Tsesmeli, C. E., & Zannikos, F. (2017). Evaluation of the antimicrobial activity of synthetic and natural phenolic type antioxidants in biodiesel fuel. *Fuel*, 209, 150-161.
- Domingos, A. K., Saad, E. B., Vechiatto, W. W., Wilhelm, H. M., & Ramos, L. P. (2007). The influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (biodiesel). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(2), 416-423.
- Dunn, R. O. (2002). Effect of oxidation under accelerated conditions on fuel properties of methyl soyate (biodiesel). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(9), 915-920.
- Dutra, R. C., Matos, C. L., Farias, H. R., Prauchner, M. J., Suarez, P. A. Z., & Rangel, E. T. (2016). Modificação de biodiesel metílico de soja para obtenção de aditivos com atividade biocida. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G.

- L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 703-704). Natal.
- Fakas, S. (2017). Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 292-302.
- Feitosa, W. S. C., Vasconcelos, M. M. L., & Silva, M. C. D. (2016). Avaliação térmica do biodiesel de soja aditivado com eugenol. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1353-1354). Natal.
- Fernades, F. S., Franco, M. M., Neto, W. B., Santos, D. Q., & Harter, L. V. L. Uso de própolis como antioxidante para biocombustíveis. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 853-854). Natal.
- Fernandes Jr., V. J., Araujo, A. S., Vinhado, F. S., & Pivesso, P. R. (2012). Caracterização de resíduo sólido formado em biodiesel de sebo bovino. *Quim. Nova*, 35(10), 1901-1906.
- Ferrari, R. A., de Souza, W. L. (2009). Evaluation of oxidation stability of sunflower oil biodiesel with antioxidants. *Química Nova*, 32(1), 106-111.
- Ferrari, R. A., Souza, W. L. (2009). Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. *Química Nova*, 32(1), 106-111.
- Ferraz, F. A., Muniz-Wypych, A. S., Silva, F. L., Oliveira, A. R. S., & César-Oliveira, M. A. F. (2016). Melhoria das propriedades de fluxo frio de biodiesel metílico de soja e biodiesel comercial utilizando copolímeros de undecenoato de alquila. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º*

- Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1165-1166). Natal.
- Ferraz, F. M. B., Neuana, N. F., & Silva, M. L. C. P. (2016). Estudo da ação antioxidante do caroço de abacate ralado na estabilidade termo oxidativa do biodiesel de soja. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 809-810). Natal.
- Fonseca, M. M. B., Minnicelli, C. F., Silva-Portela, R. D. C. B., de Farias, M. F., dos Santos, P. R. S., Fernandes, G. J. T. et al. (2019). Unlocking and functional profiling of the bacterial communities in diesel tanks upon additive treatment. *Fuel*, 236, 1311-1320.
- Fortunato, G. R., & Flumignan, D. L. (2016). Otimização do Ponto de Entupimento de Filtro a Frio do Biodiesel de Sebo a partir da Adição de Agentes Surfactantes e Anticongelantes usando Planejamento de Experimentos. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1311-1312). Natal.
- Franco, A. L. C., Lôbo, I. P., Cruz, R. S. D., Teixeira, C. M. L. L., Almeida Neto, J. A. D., & Menezes, R. S. (2013). Biodiesel from microalgae: progress and challenges. *Química Nova*, 36(3), 437-448.
- Fregolente, P. B. L., Fregolente, L. V., & Maciel, M. R. W. (2012). Water content in biodiesel, diesel, and biodiesel–diesel blends. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 57(6), 1817-1821.
- Gaylarde, C. C., Bento, F. M., & Kelley, J. (1999). Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Revista de microbiologia*, 30(1), 01-10.
- Gaylarde, C.C. (1995). Design, selection and use of biocides. In Gaylarde, C. C., & Videla, H. A. (Eds.). *Bioextraction and Biodeterioration of metals*. (The biology of world resources series, pp. 327-261). Cambridge: Cambridge University Press.

- Goold, H., Beisson, F., Peltier, G., & Li-Beisson, Y. (2015). Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant cell reports*, 34(4), 545-555.
- Graeff, M. (2018). Lipid droplet-mediated lipid and protein homeostasis in budding yeast. *FEBS letters*, 592(8), 1291-1303.
- Guerrero, V. S., Neuana, N. F., & Silva, M. L. C. P. (2016). Estudo da estabilidade termo oxidativa de biodiesel de soja aditivado com hidroxitolueno butilado (BHT) na estocagem em vidro a 60 graus Celsius. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 807-808). Natal.
- Gutheil, N. G. (1966). *Ocorrência de Cladosporium resinae (Lindau) de Vries em querosene de aviação no Brasil. Boletim No. 9*. Porto Alegre: Instituto Tecnológico do RS.
- Harter, L. V. L., Silva, D. M., Santos, D. Q., Gontijo, L. C., & Neto, W. B. (2016). Comparação de antioxidantes sintéticos frente a contaminação metálica com cobalto em biodiesel. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 851-852). Natal.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial technology*, 39(2), 235-251.
- Hill, E. C., & Hill, G. C. (2009, October). Strategies for resolving problems caused by microbial growth in terminals and retail sites handling biodiesels. *International Conference on Stability, handling and use of liquid fuels*, Prague, Czech Republic, 11.
- Hill, E. C., Hill, G. C. (2008). Microbial Contamination and Associated Corrosion in Fuels, During Storage, Distribution and Use. *Advanced Materials Research*, 38, 257-268.
- Hosseinzadeh-Bandbafha, H., Tabatabaei, M., Aghbashlo, M., Khanali, M., & Demirbas, A. (2018). A comprehensive review on the environmental impacts of diesel/biodiesel additives. *Energy Conversion and Management*, 174, 579-614.

- Isa, Y. M., & Ganda, E. T. (2018). Bio-oil as a potential source of petroleum range fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, 69-75.
- Issariyakul, T., & Dalai, A. K. (2014). Biodiesel from vegetable oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 446-471.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53, 315-351.
- Jain, S., & Sharma, M. P. (2010). Stability of biodiesel and its blends: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 667-678.
- Jakeria, M. R., Fazal, M. A., & Haseeb, A. S. M. A. (2014). Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 30, 154-163.
- Justo, O. R., Moraes, Â. M., Barreto, G. P. D. M., Mercadante, A. Z., & Rosa, P. D. T. V. (2008). Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. *Química nova*, 31(7), 1699-1705.
- Karavalakis, G., Hilari, D., Givalou, L., Karonis, D., & Stournas, S. (2011). Storage stability and ageing effect of biodiesel blends treated with different antioxidants. *Energy*, 36(1), 369-374.
- Keera, S. T., El Sabagh, S. M., & Taman, A. R. (2018). Castor oil biodiesel production and optimization. *Egyptian Journal of Petroleum*, 27, 979–984.
- Kleinberg, M. N., Rios, M. A., Buarque, H. L., Parente, M. M., Cavalcante, C. L., & Luna, F. M. T. (2017). Influence of Synthetic and Natural Antioxidants on the Oxidation Stability of Beef Tallow Before Biodiesel Production. *Waste and Biomass Valorization*, 1, 1-7.
- Kleinberg, M. N., Sales, A. V., Rios, I. C., Rios, M. A. S., Luna, F. M. T., Parente, M. M. V. et al. (2016). Avaliação do uso de antioxidantes comerciais na estabilidade oxidativa de sebo bovino. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 891-892). Natal.
- Klinkspon, N. (2009, October). Impact of biodeterioration in diesel fuel systems. *International Conference on Stability, handling and use of liquid fuels*, Prague,

- Czech Republic, 11.
- Knothe G. (2007). Some aspects of biodiesel oxidative stability. *Fuel Process. Technol.*, *88*, 669–677.
- Knothe, G., & Razon, L. F. (2017). Biodiesel fuels. *Prog. Energy Combust. Sci.*, *58*, 36-59.
- Kumar, N. (2017). Oxidative stability of biodiesel: Causes, effects and prevention. *Fuel*, *190*, 328-350.
- Lima, B. A. S. G., Medeiros, E. S., Cavalcanti, E. H. S., & Santos, I. M. G. (2016). Revestimento de chá verde em superfície metálica para proteção contra corrosão. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1303-1304). Natal.
- Liu, Y. Y., Chi, Z., Wang, Z. P., Liu, G. L., & Chi, Z. M. (2014). Heavy oils, principally long-chain n-alkanes secreted by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* strain P5 isolated from mangrove system. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *41*(9), 1329-1337.
- Lôbo, I. P., Ferreira, S. L. C., & Cruz, R. S. D. (2009). Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quim. Nova*, *32*(6), 1596-1608.
- Lofthus, S., Netzer, R., Lewin, A. S., Heggeset, T. M., Haugen, T., & Brakstad, O. G. (2018). Biodegradation of n-alkanes on oil–seawater interfaces at different temperatures and microbial communities associated with the degradation. *Biodegradation*, *29*(2), 141-157.
- Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2011). Lipase and esterase – to what extent can this classification be applied accurately? *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, *31*(3), 608-613.
- Luz, G., Sousa, B., Guedes, A., Barreto, C., & Brasil, L. (2018). Biocides Used as Additives to Biodiesels and Their Risks to the Environment and Public Health: A Review. *Molecules*, *23*(10), 2698.
- Lyles, C. N., Aktas, D. F., Duncan, K. E., Callaghan, A. V., Stevenson, B. S., & Suflita, J. M. (2013). Impact of organosulfur content on diesel fuel stability and implications for carbon steel corrosion. *Environmental Science & Technology*, *47*(11), 6052-

6062.

- Macedo, G. A., & Macedo, J. A. (2004). Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. *Biocombustíveis: Ciência e Desenvolvimento*, 32(1), 38-46.
- Maciel, G. S., Souza, A. L., Santos, I. G., & Queiroz, N. (2016). Efeito de antioxidantes aminados, do ácido ferúlico e do ferulato de metila na estabilidade oxidativa do biodiesel de algodão. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1039-1040). Natal.
- Mahmudul, H. M., Hagos, F. Y., Mamat, R., Adam, A. A., Ishak, W. F. W., & Alenezi, R. (2017). Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72, 497-509.
- Maia, R. R. S. (2012). *Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB): Implicações de uma Análise Custo Benefício*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- Manitchotpisit, P., Price, N. P., Leathers, T. D., & Punnapayak, H. (2011). Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, 33(6), 1151-1157.
- Marques Jr., J. G., & Antoniosi Filho, N. R. (2016). Avaliação da Cinética Oxidativa de Biodiesel B100 na presença de Biocidas. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1207-1208). Natal.
- Martins, L. O. S., & Carneiro, R. A. F. (2017). Towards the B20? An Analysis of the Capacity and Potential of Biodiesel Production in Brazil. *Weber Economics & Finance*, 4(1), 217-223.
- Mattei, L. (2010). Programa nacional para produção e uso do biodiesel no Brasil (PNPB): trajetória, situação atual e desafios. *Revista Econômica do Nordeste*, 41(4), 731-740.
- Mattos, R. A. (2012). *Estudo da influência de aditivos naturais nos pontos de*

- entupimento a frio, de turbidez e de fulgor de biodiesel e de misturas diesel-biodiesel*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Medeiros, M. L. D. (2013). *Extrato de Alecrim (Rosmarinus officinalis L.): Um antioxidante eficiente para uso no biodiesel*. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba.
- Medeiros, M. L., Cordeiro, A. M., Queiroz, N., Soledade, L. E., Souza, A. L., & Souza, A. G. (2014). Efficient antioxidant formulations for use in biodiesel. *Energy & Fuels*, 28(2), 1074-1080.
- Meneghetti, M. R., & Meneghetti, S. M. P. (2015). Sn (IV)-based organometallics as catalysts for the production of fatty acid alkyl esters. *Catalysis Science & Technology*, 5(2), 765-771.
- Menezes, R. S., Leles, M. I. G., Soares, A. T., Franco, P. I. B., Antoniosi Filho, N. R., & Vieira, A. A. H. (2013). Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. *Quim. Nova*, 36(1), 10-15.
- Ministério de Minas e Energias. (2018). *Balanço Energético Nacional 2018: Relatório Síntese 2017*. Rio de Janeiro: EPE.
- Miyoshe, M. (1985). Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. *Jahrbuch für Wissenschaftliche Botanik*, 28, 269-289.
- Mori, V., Soares, R. O., Santos, V. R. G., & Cavalcanti, E. H. S. (2016). Estudo Comparativo da Estabilidade ao Armazenamento na Presença de Aditivos Verdes e Sintéticos do Biodiesel Metílico de Soja em Condições de Estocagem Simulada em Recipientes de Aço Carbono por 60 Dias. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1243-1244). Natal.
- Mota, C. J. A., & Pestana, C. F. (2011). Co-produtos da Produção de Biodiesel. *Revista Virtual de Química*, 3(5), 416-425.
- Mota, C. J., Silva, C. X. D., & Gonçalves, V. L. (2009). Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Química Nova*, 32(3),

639-648.

- Muniz-Wypych, A. S. (2016). *Desenvolvimento de aditivos bifuncionais de ação antioxidante e anticongelante para biodiesel*. Tese de Doutorado, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- Muniz-Wypych, A. S., Inoue, M. H., Costa, M. M., Oliveira, A. R. S., & César-Oliveira, M. A. F. (2016). Síntese de aditivos fenólicos com ação antioxidante para o biodiesel de canola. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1399-1400). Natal.
- Muniz-Wypych, A. S., Inoue, M. H., Oliveira, D. C., Costa, V. G., Oliveira, A. R. S., César-Oliveira, M. A. F. (2016). Redutores do ponto de fluidez do biodiesel de soja: polimetacrilatos. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1401-1402). Natal.
- Muniz-Wypych, A. S., Silva, F. L., Costa, M. M., Oliveira, A. R. S., Mittelbach, M., Luiz Pereira Ramos, L. P. et al. (2016). Aditivos fenólicos antioxidantes derivados de oleato de metila para biodiesel. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1403-1404). Natal.
- Muniz-Wypych, A. S., Yasmin Vieira, Y., Oliveira, A. R. S., Mittelbach, M., & César-Oliveira, M. A. F. (2016). Estudo do comportamento do biodiesel de canola frente à estabilidade oxidativa utilizando aditivos fenólicos comerciais. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1267-1268). Natal.

- Myers, F. (2008). Biocidal agents: modes of action and correlation with antibiotic resistance. *Biomedical Scientist*, 52(3), 227.
- Neto, B. A. D., Alves, M. B., Lapis, A. A., Nachtigall, F. M., Eberlin, M. N., Dupont, J. et al. (2007). 1-n-Butyl-3-methylimidazolium tetrachloro-indate (BMI·InCl₄) as a media for the synthesis of biodiesel from vegetable oils. *Journal of Catalysis*, 249(2), 154-161.
- Neuana, N. F. (2016). *Avaliação do comportamento termo oxidativo de biodiesel aditivado com produtos naturais*. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.
- Ng, Y. F., Ge, L., Chan, W. K., Tan, S. N., Yong, J. W. H., & Tan, T. T. Y. (2015). An environmentally friendly approach to treat oil spill: investigating the biodegradation of petrodiesel in the presence of different biodiesels. *Fuel*, 139, 523-528.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006.
- Obermaier, M., & La Rovere, E. L. (2012). Vulnerabilidade e resiliência socioambiental no contexto da mudança climática: o caso do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB). *Parcerias estratégicas*, 16(33), 109-134.
- Oliveira, C. D. J., Schaffner, R. A., Cremonez, P. A., Feroldi, M., & Teleken, J. G. (2014). Produção de biodiesel a partir das algas: uma revisão. *Journal of Agronomic Sciences*, 3(especial), 202-221.
- Oliveira, F. C., & Coelho, S. T. (2017). History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75, 168-179.
- Oliveira, R. S., Machado, P. M. A., Ramalho, H. F., Rangel, E. T., Suarez, P. A. Z. (2017). Acylation of epoxidized soybean biodiesel catalyzed by SnO/Al₂O₃ and evaluation of physical chemical and biologic activity of the product. *Industrial Crops and Products*, 104, 201-209.
- Oliveira, R. S., Silva, E. A., Rodrigues, P. R. P., & Souza, S. N. M. (2014). Avaliação da ação antioxidante de produtos naturais no biodiesel B100 (*Glycine max*). *Engevista*, 16(3), 410-419.
- Owsianiak, M., Chrzanowski, Ł., Szulc, A., Staniewski, J., Olszanowski, A., Olejnik-Schmidt, A. K. et al. (2009). Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: effect of the type of blend and the addition

- of biosurfactants. *Bioresource Technology*, 100(3), 1497-1500.
- Parente Júnior, E. J. S. (2016). A evolução da indústria do Biodiesel no Brasil. In Menezes, R. S. (Org.). *Biodiesel no Brasil: Impulso tecnológico* (Vol. 1, Cap. 1). Lavras, UFLA.
- Parente, E. J. S., Santos Junior, J. N., Bastos, J. A., & Parente Junior, E. J. S. (2003). *Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado*. Fortaleza: Tecbio.
- Pasqualino, J. C., Montané, D., & Salvadoó, J. (2006). Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass & Bioenergy*, 30, 874-879.
- Passman, F. (2000, September). New guides for diagnosing and controlling microbial contamination in fuel and fuel systems. *International Conference in Stability, Handling, and Use of Liquid Fuels* (pp. 24-29), Spain, 7.
- Passman, F. J. (2013). Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980—a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 88-104.
- Passman, F. J., Kelley, J., & Whalen, P. (in press). Interlaboratory study comparing two fuel microbiology standard test methods. *International biodeterioration & biodegradation*, 2018.
- Passman, F., & Dobranick, J. K. (2005, September). Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. *Proceedings of the International Conference in Stability, Handling, and Use of Liquid Fuels*, Sitges, Spain, 9.
- Pinho, D. M. M., Suarez, P. A. Z., Meneghetti, S. M. P., & Rangel, E. T. (2016). Problemas de formação de borras durante a estocagem verificados após a obrigatoriedade do biodiesel e as possíveis causas. In Pinho, D. M. M., & Suarez, P. A. Z. (Orgs.), *Armazenagem e Uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle*. (1a. ed.). Brasília: CDT, UNB.
- Pinho, D. M., Oliveira, R. S., dos Santos, V. M., Marques, W. F., Pinto, A. C., Rezende, M. J. et al. (2017). Evaluating the Potential of Biodiesel Production through Microalgae Farming in Photobioreactor and High Rate Ponds from Wastewater Treatment. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(12), 2429-2437.
- Pinho, L. D. A., & Teixeira, F. L. C. (2015). Biodiesel no Brasil: uma análise da regulação e seus reflexos na diversificação das matérias-primas usadas no processo de produção. *Rev Bras Adm Pol*, 8(2), 141-161.
- Plata, V., Gauthier-Maradei, P., Romero-Bohórquez, A. R., Kafarov, V., & Castillo, E. (2015). Characterization of insoluble material isolated from Colombian palm oil

- biodiesel. *Biomass Bioenergy*, 74, 6-14.
- Pottmaier, D., Melo, C. R., Sartor, M. N., Kuester, S., Amadio, T. M., Fernandes, C. A. H. et al. (2013). The Brazilian energy matrix: From a materials science and engineering perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 678-691.
- Pyc, M., Cai, Y., Greer, M. S., Yurchenko, O., Chapman, K. D., Dyer, J. M. et al. (2017). Turning over a new leaf in lipid droplet biology. *Trends in plant science*, 22(7), 596-609.
- Raikos, V., Vamvakas, S. S., Sevastos, D., Kapolos, J., Karaiskakis, G., & Koliadima, A. (2012). Water content, temperature and biocide effects on the growth kinetics of bacteria isolated from JP-8 aviation fuel storage tanks. *Fuel*, 93, 559-566.
- Rajasekar, A., Maruthamuthu, S., Ting, Y. P., Balasubramanian, R., & Rahman, P. K. (2012). Bacterial degradation of petroleum hydrocarbons. In Singh, S. N. (Ed.). *Microbial Degradation of Xenobiotics* (pp. 339-369).
- Ramos, L. P., Kothe, V., César-Oliveira, M. A. F., Muniz-Wypych, A. S., Nakagaki, S., Krieger, N. et al. (2017). Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. *Rev. Virtual Quim*, 9(1), 317-369.
- Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casas, A., Rodríguez, L., & Pérez, Á. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource technology*, 100(1), 261-268.
- Renewable Energy Policy Network for the 21st Century. *Renewables 2018 Global Status Report*. (2018). Paris: REN21 Secretariat.
- Ribeiro, B. D., Castro, A. M. D., Coelho, M. A. Z., & Freire, D. M. G. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme research*, 2011.
- Ribeiro, D. S., Nobre, T. S., Andrade, F. M. M., Costa, M. F. C., Queiroz, N., Santos, I. M. G. et al. (2016). Extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em composição binária com TBHQ no controle da oxidação do biodiesel de algodão durante estocagem. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1003-1004). Natal.

- Ribeiro, N. M., Pinto, A. C., Quintella, C. M., da Rocha, G. O., Teixeira, L. S., Guarieiro, L. L. et al. (2007). The role of additives for diesel and diesel blended (ethanol or biodiesel) fuels: a review. *Energy & fuels*, 21(4), 2433-2445.
- Rocha, F. N., & Suarez, P. A. Z. (2016). Síntese de Aditivo antioxidante e biocida planejado a partir quinonas funcionalizadas. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1047-1048). Natal.
- Russel, A. D. (2003). Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(12), 794-803.
- Saavedra M., M. R., Fontes, C. H. D. O., & Freires, F. G. M. (2018). Sustainable and renewable energy supply chain: A system dynamics overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 247-259.
- Sampaio, R. M., & Bonacelli, M. B. M. (2018). Tecnologias renováveis: interação entre políticas públicas e iniciativa privada, a partir da produção brasileira de biodiesel. *R. Technol. Soc.*, 14(34), 17-34.
- Santos, J. J., Goncalves, C. F., Corrêa, S. R. S., & Estival, K. G. S. (2017). Parcerias entre Brasil e Estados Unidos na promoção dos biocombustíveis para o desenvolvimento sustentável. *Revista Espacios Públicos*, 49, 43-62.
- Santos, M. M. (2009). *Caracterização bioquímica de uma esterase halofílica de Haloarcula marismortui*. Tese de Doutorado, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- Santos, S. B., Rodrigues, L. M., & Teixeira, H. M. (2016). Efeito da adição de extrato alcoólico de sementes de mostarda marrom (*Brassica juncea*) sobre a estabilidade oxidativa de biodiesel de soja. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1025-1026). Natal.
- Sharifzadeh, M., Sadeqzadeh, M., Guo, M., Borhani, T. N., Konda, N. M., Garcia, M. C. et al. (2019). The multi-scale challenges of biomass fast pyrolysis and bio-oil

- upgrading: Review of the state of art and future research directions. *Progress in Energy and Combustion Science*, 71, 1-80.
- Silva, C. L., Santana, P. M. B., & Meira, M. (2016). Testes de imersão em aditivos candidatos a inibidores de corrosão metálica em biodiesel. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1289-1290). Natal.
- Silva, E. S., Xavier, F. D., Silva, D. D., Cordeiro, A. M. T. M., Alcantara, M. A., Santos, I. M. G. et al. (2016). Avaliação da atividade antioxidante de extratos de folhas de nim e maracujá. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1086-1087). Natal.
- Silva, F. L., Baena, T. M. F., Muniz-Wypych, A. S., Ferraz, F. A., Oliveira, A. R. S., & César-Oliveira, M. A. F. (2016). Aditivos anticongelantes derivados de ácido acrílico e metacrilatos, para biodiesel. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1131-1132). Natal.
- Silva, G. S., Marques, E. L. S., Dias, J. C. T., Lobo, I. P., Gross, E., Brendel, M. et al. (2012). Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. *Applied Soil Ecology*, 55, 27-35.
- Sims, K. J., Spassieva, S. D., Voit, E. O., & Obeid, L. M. (2004). Yeast sphingolipid metabolism: clues and connections. *Biochemistry and cell biology*, 82(1), 45-61.
- Singh, A., & Poeta, M. D. (2016). Sphingolipidomics: an important mechanistic tool for studying fungal pathogens. *Frontiers in microbiology*, 7, 501.
- Soares, I. M. S., Franco, M. M., Neto, W. B., Santos, D. Q., & Gontijo, L. C. (2016). Potenciais antioxidantes de própolis e pólen no biodiesel. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa,*

- desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 827-828). Natal.
- Song, C. (2003). An overview of new approaches to deep desulfurization for ultra-clean gasoline, diesel fuel and jet fuel. *Catalysis Today*, 86(1-4), 211-263.
- Soriano, A. U., Martins, L. F., Ventura, E. S. A., de Landa, F. H. T. G., Valoni, E. A., Faria, F. R. D. et al. (2015). Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 99, 102-114.
- Sousa, L. S., de Moura, C. V. R., de Oliveira, J. E., & de Moura, E. M. (2014). Use of natural antioxidants in soybean biodiesel. *Fuel*, 134, 420-428.
- Souza, S. P., Seabra, J. E., & Nogueira, L. A. H. (2018). Feedstocks for biodiesel production: Brazilian and global perspectives. *Biofuels*, 9(4), 455-478.
- Spacino, K. R., da Silva, E. T., Angilelli, K. G., Moreira, I., Galão, O. F., & Borsato, D. (2016). Relative protection factor optimisation of natural antioxidants in biodiesel B100. *Industrial Crops and Products*, 80, 109-114.
- Speight, J. G. (2014). *The chemistry and technology of petroleum*. 5th ed. Boca Raton: CRC Press.
- Suarez, P. A., & Meneghetti, S. M. P. (2007). 70th anniversary of biodiesel in 2007: historical evolution and current situation in Brazil. *Química Nova*, 30(8), 2068-2071.
- Suarez, P. A., Santos, A. L., Rodrigues, J. P., & Alves, M. B. (2009). Oils and fats-based biofuels: technological challenges. *Química nova*, 32(3), 768-775.
- Suzuki, Y., Miyamoto, K., & Ohta, H. (2004). A novel thermostable esterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *FEMS Microbiology Letters*, 236, 97-102.
- Tacias-Pascacio, V. G., Torrestiana-Sánchez, B., Dal Magro, L., Virgen-Ortíz, J. J., Suárez-Ruíz, F. J., Rodrigues, R. C. et al. (2019). Comparison of acid, basic and enzymatic catalysis on the production of biodiesel after RSM optimization. *Renewable Energy*, 135, 1-9.
- Távora, F. L. (2011). *História e economia dos biocombustíveis no Brasil*. Brasília, DF: Senado Federal.
- Tebas, S. O. G., Pereira, A. F., da Silva, P. H. A., Pinheiro, P. F., Pinheiro, C. A., &

- Barañano, A. G. (2017). Obtenção de Biodiesel. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 4(1), 100-104.
- Tsai, S. W. (2016). Enantioference of *Candida antarctica* lipase B toward carboxylic acids: Substrate models and enantioselectivity thereof. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127, 98-116.
- Tsesmeli, C. E., Dodos, G. S., & Zannikos, F. (2017). Effect of Phenolic Type Antioxidant Additives on Microbial Stability of Biodiesel Fuel. *SAE Technical Paper 2017-01-2334*. Birmingham: Birmingham City University.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4), 503-549.
- Vargas, B. S., Lissner, L. A., & Meth, S. (2017). Características Físico-Químicas do Biodiesel conforme Especificações da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. *Revista da Mostra de Trabalhos de Conclusão de Curso Congrega Urcamp*, 1, 317-327.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277-286.
- Vieira, T. M., Silva, E. P., Antoniosi Filho, N. R., & Vieira, J. D. G. (2006). Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. *Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel*, Brasília, DF, 1.
- Vieira, Y., Muniz-Wypych, A. S., Vlnieska, V., Oliveira, A. R. S., & César-Oliveira, M. A. F. (2016). Modificação química de óleo vegetal para a obtenção de aditivos antioxidantes para biodiesel. In Neto, P. C., Fraga, A. C., Menezes, R. S., & Ramos, G. L. (Eds.) *Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil. Anais – Trabalhos científicos. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel* (Vol. 2, pp. 1179-1180). Natal.
- Vignesh, G., & Barik, D. (2019). Toxic Waste from Biodiesel Production Industries and Its Utilization. In Barik, D. (Ed.). *Energy from Toxic Organic Waste for Heat and Power Generation* (pp. 69-82). Woodhead Publishing.
- Wang, C. L., Li, Y., Xin, F. H., Liu, Y. Y., & Chi, Z. M. (2014). Single cell oil production by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* P10 isolated from mangrove systems for biodiesel making. *Proc. Biochem.*, 49, 725-731.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerzys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic

- compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.
- Yaakob, Z., Narayanan, B. N., & Padikkaparambil, S. (2006). A review on the oxidation stability of biodiesel. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 35, 136-153.
- Yemanshova, N. A., Murygina, V. P., Zhukov, D. V., Zakharyantz, A. A., Gladchenko, M. A., Appanna, V. et al. (2007). Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 6(4), 315-337.
- Zehra, A., Dubey, M. K., Meena, M., Aamir, M., Patel, C. B., & Upadhyay, R. S. (2018). Role of Penicillium Species in Bioremediation Processes. In Gupta, V. (Ed.). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 247-260). Elsevier.
- Zhang, X., Peterson, C., Reece, D., Haws, R., & Möller, G. (1998). Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Transactions of the ASAE*, 41(5), 1423-1430.
- Zhang, Y., Liu, Y., Dong, H., Li, X., & Zhang, D. (2016). The nonylphenol biodegradation study by estuary sediment-derived fungus *Penicillium simplicissimum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 15122-15132.
- Zimmer, A. R., Oliboni, A., Viscardi, S. L., Teixeira, R. M., Ferrão, M. F., & Bento, F. M. (2017). Biodiesel blend (B10) treated with a multifunctional additive (biocide) under simulated stored conditions: a field and lab scale monitoring. *Biofuel Research Journal*, 4(2), 627-636.
- Zimmer, A., Cazarolli, J., Teixeira, R. M., Viscardi, S. L. C., Cavalcanti, E. S. H., Gerbase, A. E. et al. (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.
- Zuniga, A. D. G., Paula, M. M., Coimbra, J. S. D. R., Martins, E. C. A., Silva, D. X. D., & Telis-Romero, J. (2011). Revisão: propriedades físico-químicas do biodiesel. *Pesticidas*, 21, 55-72.

11 ANEXO A

Laudo do Biodiesel utilizado nos estudos das Seções Capítulos 4, 5 e 7.

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE DE BIODIESEL					
CERTIFICADO DE QUALIDADE					
3 TENTOS AGROINDUSTRIAL S/A					
Número: CQ.LCB.030/2016			Data: 18/10/2016		
1. ORIGINAÇÃO DO BIODIESEL					
ROTA ALCOOLICA:		Metílica	MATÉRIA PRIMA:		100 % Óleo De Soja
2. AMOSTRAGEM					
LOTE:		TQ51413102016	TANQUE:		TQ514
VOLUME DO LOTE:		2100m ³	LACRES DO TANQUE:		0017413; 0017454;
DATA DE PRODUÇÃO:		23/09/2016 a 01/10/2016	LACRES DAS AM. TESTEMUNHAS:		0017496
DATA DA ANÁLISE:		14/10/2016 a 18/10/2016	0017458; 0017487		
3. INFORMAÇÕES ADICIONAIS					
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.					
4. RESULTADOS ANALÍTICOS					
ANÁLISES	RESULTADO	UNIDADE	LIMITE	NORMA DE REFERÊNCIA	LABORATÓRIO/BBD
Aspecto	LII -28,8 ⁽²⁾	-	LII (1)	VISUAL	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Massa específica a 20°C	881,5	kg/m ³	850 - 900	NBR 14065:2013	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Viscosidade cinemática a 40°C	4,131	mm ² /s	3,0 - 6,0	NBR 10441:2014	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Teor de água	196	mg/kg	máx: 200	EN ISO 12937:2000	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Contaminação total	11,0	mg/kg	máx: 24	EN 12662/2008	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Ponto de fulgor	147	°C	mín: 100,0	ASTM D 93/2016 Procedimento C	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Cinzas Sulfatadas	<0,005	% massa	máx: 0,020	NBR 6294:2008	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Teor de Éster	99,4	% massa	mín: 96,5	EN 14103/2011	BSBIOS/**BBD 245/2016
Enxofre Total	0,5	mg/kg	máx: 10	ASTM D 5453/2012	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Sódio + potássio	1,5	mg/kg	máx: 5	EN 14538/2006	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Cálcio + magnésio	<0,5	mg/kg	máx: 5	EN 14538/2006	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Fósforo	<0,5	mg/kg	máx: 10	EN 14107/2003	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Corrosão ao Cobre, 3h a 50°C	1b	-	1	NBR 14359:2013	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Ponto de Entupimento	-6	°C	máx: 10	NBR 14747:2015	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Índice de acidez	0,18	mg KOH/g	máx: 0,50	NBR 14448:2013 Método B	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Glicerol livre	0,010	% massa	máx: 0,020	ASTM D 6584/2013 ^{e1}	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Glicerol total	0,183	% massa	máx: 0,25	ASTM D 6584/2013 ^{e1}	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Monoacilglicerol	0,637	% massa	máx: 0,70	ASTM D 6584/2013 ^{e1}	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Diacilglicerol	0,067	% massa	máx: 0,20	ASTM D 6584/2013 ^{e1}	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Triacilglicerol	<0,00092857	% massa	máx: 0,20	ASTM D 6584/2013 ^{e1}	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Índice de Iodo	132	gI ₂ /100g	Anotar	EN 14111/2003	BIANCHINI/*BBD 206 – 16
Estabilidade a oxidação a 110°C	8,4	h	mín: 8	EN 14112/2003	BIANCHINI/*BBD 206 – 16

*BBD = Boletim de Análise emitido pelo Laboratório Externo BIANCHINI cadastrado na ANP sob nº 051;
**BBD = Boletim de Análise emitido pelo Laboratório Externo BSBIOS cadastrado na ANP sob nº 007;
⁽¹⁾ Límpido Isento de Impurezas ⁽²⁾ Temperatura durante a observação.

MARCIA VERONEZE BISOL
RESPONSÁVEL TÉCNICA
CRQ V05202059

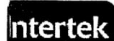
26 OUT. 2016

3 Tentos Agroindustrial SA - Fone/Fax (55) 3332-4446 - e-mail: lcq.biodiesel@3tentos.com.br
BR 285 - Km 461.5 - Zona Rural - Ijuí - RS - 98700-000
CNPJ: 94.813.102/0017-37 I.E.: 0650.138.570

RECEBIDO

12 ANEXO B

Laudo do Diesel S10 utilizado no estudo apresetado na Seção 5.



PRODUCT : DIESEL S10
 VESSEL : MT SILVER GINNY
 CLIENT : BCI
 SAMPLES DRAWN BY : INTERTEK DO BRASIL INSPEÇÕES LTDA
 REPRESENTING : SHIP'S TANKS COMPOSITE
 DATE OF ANALYSIS : OCTOBER 08th, 2016
 CEB REF. : RG-7001/2016

REPORT OF ANALYSIS

Analysis performed by Intertek do Brasil Inspeções Ltda

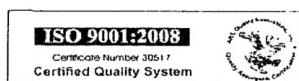
Tests	Unit	Method	Specifications or Contract Limits	Results Ship's tanks composite
Appearance	-	ASTM D 4176	-	Clear liquid free of Impurities
Color	-	Visual	-	Yellowish
ASTM Color	-	ASTM D 1500	Max 3.0	(a)
Sulfur	mg/kg	ASTM D 5453	Max. 10	(a)
Dist. 10% Recovered	°C	ASTM D 86	-	189.8
Dist. 50% Recovered	°C	ASTM D 86	Min 245 / Max. 295	257.8
Dist. 15% Recovered	°C	ASTM D 86	-	308.8
Dist. 10% Recovered	°C	ASTM D 86	-	317.8
Dist. 15% Recovered	°C	ASTM D 86	Max. 370	329.8
Density @ 20°C	kg/m³	ASTM D 4052	815.0 - 850.0	830.1
FlashPoint	°C	ASTM D 93	Min. 38	(a)
Viscosity @ 40 °C	mm²/S	ASTM D 445	2.0 - 4.5	(a)
CFPP	°C	ASTM D 6371	Max. 7	(a)
Cetane Number	-	ASTM D 613	Min. 48.0	(a)
Carbon Residue, Ramsbottom on 10% Bott.	Mass%	ASTM D 524	Max. 0.25	(a)
Ash	Mass%	ASTM D 482	Max. 0.010	< 0.01
Copper Corrosion @ 50 °C (3 hrs)	-	ASTM D 130	Max. 10	(a)
Water content	mg/kg	ASTM D 6304	Max. 200	55.7
Total Contamination	mg/kg	EN 12662	Max. 24	(a)
Sediment & Water	vol%	ASTM D 2709	-	(a)
Determination of the Aromatic Content and Polynuclear Aromatic Content	Mass%	ASTM D 5186	Max. 11	(a)
Stability oxidation	mg/100mL	ASTM D 2274	Max. 2.5	(a)
Neutralization Number	mg/KOH/g	ASTM D 974	-	(a)
Lubricity -HFRR	µm	ASTM D 6079	Max. 520	(a)
Wear Scar Diameter @ 60° C	-	-	-	(a)
Electrical Conductivity	pS/m	ASTM D 2624	Min. 25	237.6
Electrical Conductivity Temp.	°C	ASTM D 2624	-	22.1

REMARK:

- 1) Analysis as ANP n° 50 de 23/12/2013, DOU 24.12.2013
- 2) Ship's Tanks Composite (4P/S, 6P and 6S)
- 3) (a) Analysis in progress. We will inform ASAP

Rio Grande, October 08th, 2016

Intertek do Brasil Inspeções Ltda
Patricia Gonçalves



13 ANEXO C

Laudo do Biodiesel B100 puro utilizado nos estudos das Seções 6 e 7.

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE DE BIODIESEL					
CERTIFICADO DE QUALIDADE					
3 TENTOS AGROINDUSTRIAL S/A					
Número: CQ.LCB.018/2018			Data: 03/05/2018		
1. ORIGINAÇÃO DO BIODIESEL					
ROTA ALCOOLICA:	Metilica	MATÉRIA PRIMA:	100 % Óleo De Soja		
2. AMOSTRAGEM					
LOTE:	TQ51527042018	TANQUE:	TQ515 031804; 031810;		
VOLUME DO LOTE:	2100 m ³	LACRES DO TANQUE:	031876		
DATA DE PRODUÇÃO:	20/04/2018 a 27/04/2018	LACRES DAS AM. TESTEMUNHAS:	031862; 031867		
DATA DA ANÁLISE:	30/04/2018 a 02/05/2018				
3. INFORMAÇÕES ADICIONAIS					
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.					
4. RESULTADOS ANALÍTICOS					
ANÁLISES	RESULTADO	UNIDADE	LIMITE	NORMA DE REFERÊNCIA	LABORATÓRIO/BBD
Aspecto	LII – 28,0 ⁽²⁾	-	LII (1)	IT-BIO-001 - 04	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Massa específica a 20°C	881,1	kg/m ³	850 - 900	NBR 14065:2013	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Viscosidade cinemática a 40°C	4,111	mm ² /s	3,0 - 6,0	NBR 10441:2014	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Teor de água	158	mg/kg	máx: 200	EN ISO 12937:2000	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Contaminação total	< 6,0	mg/kg	máx: 24	EN 12662/2008	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Ponto de fulgor	141,0	°C	mín: 100,0	ASTM D 93/2016a Procedimento C	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Teor de Éster	98,7	% massa	mín: 96,5	EN 14103/2011	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Enxofre Total	0,8	mg/kg	máx: 10	ASTM D 5453-16 ^{F1}	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Sódio + potássio	< 0,5	mg/kg	máx: 5	EN 14538/2006	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Cálcio + magnésio	< 0,5	mg/kg	máx: 5	EN 14538/2006	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Fósforo	< 0,5	mg/kg	máx: 10	EN 14107/2003	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Ponto de Entupimento	- 6	°C	máx: 5	NBR 14747:2015	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Índice de acidez	0,26	mg KOH/g	máx: 0,50	NBR 14448:2013 Método B	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Glicerol livre	0,004	% massa	máx: 0,020	ASTM D 6584/2017	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Glicerol total	0,184	% massa	máx: 0,25	ASTM D 6584/2017	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Monoacilglicerol	0,639	% massa	máx: 0,70	ASTM D 6584/2017	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Diacilglicerol	0,094	% massa	máx: 0,20	ASTM D 6584/2017	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Triacilglicerol	0,036	% massa	máx: 0,20	ASTM D 6584/2017	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Índice de Iodo	128	gI ₂ /100g	Anotar	EN 14111/2003	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
Estabilidade a oxidação a 110°C	9,6	h	mín: 8	EN 14112/2016	BIANCHINI/*BBD 077 – 18
*BBD = Boletim de Análise emitido pelo Laboratório Externo BIANCHINI cadastrado na ANP sob nº 051; ⁽¹⁾ Límpido Isento de Impurezas ⁽²⁾ Temperatura durante a observação.					

MARCIA BISOL PAGLIARINI
RESPONSÁVEL TÉCNICA
CRQV 05202059