

Natureza dos metabólitos produzidos durante a degradação da mistura B10 com diferentes teores de enxofre

Aline Oliboni de Azambuja (LAB-BIO/UFRGS, alineoliboni@gmail.com), Juciana Clarice Cazarolli (LAB-BIO/UFRGS, jucianacazarolli@gmail.com); Vincent Bonifay (BC/OU Vincent.Bonifay-1@ou.edu); Jan Arne Sunner (BC/OU jan.sunner-1@ou.edu); Iwona Boguslavia Beech (BC/OU, ibeech@ou.edu); Fátima Menezes Bento (LAB-BIO/UFRGS, fatima.bento@ufrgs.br)

Palavras Chave: mistura B10, metabolômica, biodegradação, teores de enxofre, microrganismos, ácidos graxos.

1 - Introdução

Os combustíveis armazenados, especialmente o biodiesel e misturas, quando estocados por longos períodos, sem uma rotina rígida de “Boas Práticas”, ficam mais suscetíveis a formação de água livre e consequente degradação química e biológica com graves implicações para os mercados de distribuição e usuários finais¹. A fase aquosa é o principal meio onde os microrganismos se desenvolvem e secretam os metabólitos que são produtos das atividades de degradação².

De uma forma geral, a degradação aeróbia de alifáticos, (maior grupo estrutural do diesel), inicia com a oxidação metil terminal para um álcool primário, que é oxidado a um aldeído e a seguir a um ácido graxo. Os ácidos graxos são degradados via β -oxidação ou são utilizados pelas células para a construção das biomoléculas³. Na biodegradação do biodiesel, as enzimas microbianas lipases e esterases fazem a clivagem do metil ou etil éster resultando em um ácido graxo e um álcool associado, sendo os ácidos graxos incorporados às células microbianas por processos de β -oxidação⁴. Assim, independe do tipo de combustível, no processo de degradação, ocorrerá a conversão da molécula substrato em ácidos graxos, e por essa razão, as rotas metabólicas de lipídeos representam uma importante informação relacionada ao metabolismo de biossíntese e degradação de ácidos graxos.

Os metabólitos funcionam como uma “impressão digital” biológica em resposta as variações ambientais, permitindo uma melhor compreensão das atividades de microbianas. O combustível brasileiro, nos últimos dez anos, sofreu importantes alterações quando a redução dos teores de enxofre no diesel⁵ e adição de quantidades crescentes de biodiesel formando a atual⁶ mistura B7 com diesel S10/S500, instigando como será o comportamento dessa mistura em termos de estabilidade. O objetivo desse estudo foi a verificar o perfil de grupos de metabólicos, presentes na fase aquosa, indicativos da degradação microbiana da mistura B10 com diferentes teores de enxofre em condições de armazenamento simulado por 40 dias.

2 - Material e Métodos

Os combustíveis utilizados para compor a mistura B10 foram: biodiesel metílico de soja e sebo bovino (75:25) e óleo diesel A com três diferentes concentrações de enxofre: até 10 ppm S (S10), até 500 ppm S (S500) e até 1800 ppm S (S1800), fornecidos pela Ipiranga produtos de Petróleo S/A.

O experimento de estocagem simulada foi realizado em triplicata com frascos de vidro (100 mL). O

microcosmos foi composto de uma fase oleosa (20 mL) estéril contendo a mistura B10 S10, S500 e S1800 e uma fase aquosa (10 mL), com o meio mineral Bushnell-Haas (BH)⁷ estéril, simulando a água de drenagem. Um inóculo microbiano não caracterizado (ASTM 1259-10), proveniente de tanques de estocagem de diesel e misturas de biodiesel foi adicionado ao microcosmos numa concentração aproximada de 10^6 cel/esp mL⁻¹. O tratamento controle foi composto pelas mesmas condições do microcosmos, mas sem a adição do inóculo microbiano. Os frascos foram armazenados em estufa a 30 °C por 40 dias. Após esse período, as triplicatas da fase aquosa foram misturadas e formadas uma amostra composta para cada tratamento. As amostras foram acidificadas com HCl 4N, submetidas a extração da fase orgânica (2 x), com etil acetato, e secas com constante evaporação (N₂), sendo os resíduos ressuspensos em 100 μ L de isopropanol.

Para verificar a biodegradação do biodiesel foram investigados metabólitos relacionados com o metabolismo de lipídeos que fossem significativamente diferentes dos controles (estéril) e do meio mineral BH (branco). As análises foram realizadas no sistema UPLC/ Q-ToF/MS. Os dados brutos foram processados usando IDEOM versão 19, comparados com os metabólitos da base de dados KEGG e as rotas metabólicas usando o aplicativo Pathos. As análises estatísticas incluíram a Análise do Componente Principal (PCA) e um valor p de 0,05 para determinar a significativa alteração na abundância relativa dos prováveis metabólitos entre os tratamentos e controles/ branco utilizando *MetaboAnalyst* (3.0).

3 - Resultados e Discussão

Na PCA foi possível verificar que todos os tratamentos foram agrupados diferentemente dos controles (estéril) e do branco, representado pelo meio mineral BH (tempo zero) ao final de 40 dias (Figura 1). Esses resultados evidenciam a produção de diferentes metabólitos pelos distintos teores de enxofre, comparados aos controles e branco.

Em relação ao metabolismo de lipídeos, foram identificadas cinco rotas metabólicas: biossíntese de ácidos graxos, biossíntese de ácidos graxos insaturados, metabolismo do ácido α -linolênico, metabolismo do ácido α -araquidônico e metabolismo do ácido linolênico. Na Tabela 1 pode ser visualizado o número de prováveis metabólitos detectados nas amostras de fase água da mistura B10 S10, S500 e S1800 e que estão relacionadas à ativação das referidas rotas.

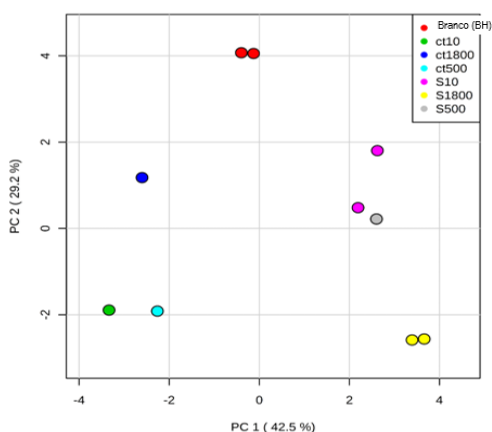


Figura 1. Análise do Componente Principal (PCA) para a produção de metabólitos microbianos relacionados ao metabolismo de lipídeos, presentes na fase aquosa da mistura B10 com diferentes teores de enxofre, após 40 dias de avaliação.

A mistura B10 S10 teve o maior número de prováveis metabólitos detectados nas rotas de biossíntese de ácidos graxos insaturados e metabolismo do ácido α -araquidônico.

Tabela 1. Rotas metabólicas de lipídeos, detectados na fase aquosa da mistura B10 com diferentes teores de enxofre, após 40 dias de avaliação.

Rotas metabólicas de lipídeos	Mistura B10		
	S10	S500	S1800
1. Biossíntese de ácidos graxos	8/11*	8/11	6/11
2. Biossíntese de ácidos graxos insaturados	10/49	8/49	9/49
3. Metabolismo do ácido α -linolênico	9/39	9/39	9/39
4. Metabolismo do ácido α -araquidônico	9/74	7/74	8/74
5. Metabolismo do ácido linoleico	5/25	5/25	5/25

*Número de prováveis metabólitos identificados nas amostras/Número de metabólitos participantes da rota metabólica pela base de dados KEGG.

Na rota metabólica referente ao metabolismo do ácido linoleico (C18:2) (Ácido *cis*, *cis* -9,12-octadecadienoico), foram detectados cinco prováveis compostos que atuam na ativação da rota. Entre eles, Linoleato (C₁₈H₃₂O₂); 9(S)-HODE (C₁₈H₃₂O₃); 9(S)-HPODE (C₁₈H₃₂O₄); e 9,12,13-TriHOME (C₁₈H₃₄O₅) apresentaram abundância relativa 10 vezes superior nos tratamentos comparados aos controles e branco (p < 0,05) e estão representados em azul na Figura 2. O composto 9,10-DHOME (C₁₈H₃₄O₄), em amarelo, teve a abundância relativa igual aos controles e branco (p < 0,05). A parcial migração dos ésteres metílicos da fase oleosa para a fase aquosa já foi reportada na literatura⁸ e a degradação abiótica também contribuem para esse fenômeno. No entanto, nesse trabalho, as evidências apontam para a degradação de origem microbiana em função da elevada quantidade de compostos oriundos da mistura B10 com diferentes teores de enxofre em relação aos controles/branco após 40 dias de avaliação.

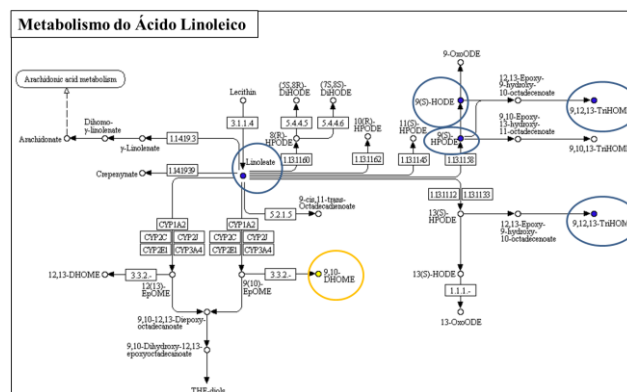


Figura 2. Rota metabólica do ácido linoleico (Ácido *cis*, *cis* -9,12-octadecadienoico) e metabólitos responsáveis pela sua ativação encontrados nas amostras da fase aquosa da mistura B10 S10, S500 e S1800, controles e branco (meio BH) após 40 dias de avaliação. Círculos em azul - prováveis metabólitos detectados com abundância relativa 10 x superior aos controles/branco. Círculo em amarelo - provável metabólito detectado na mesma proporção entre tratamentos e controles/branco.

O ácido linoleico é o ácido graxo mais abundante (~ 52 %) presente no biodiesel a base de soja². Na degradação microbiana, os ácidos graxos são intermediários formados durante o metabolismo de alcanos (diesel) ou a partir da hidrólise de ésteres metílicos (biodiesel) e consequente β -oxidação formando uma série de resíduos com dois átomos de carbonos a menos que o precursor⁹. A presença do linoleato (Figura 2), como provável metabólito da rota do ácido linoleico, sugere a ideia de produto de degradação ou do metabolismo microbiano para a mistura B10 S10, S500 e S1800. Resultados semelhantes também foram obtidos por Viera et al. (2006)¹⁰.

4 – Conclusões

Nosso estudo revelou importantes rotas metabólicas e prováveis metabólitos relacionados a degradação de ácidos graxos que podem auxiliar na compreensão da biodegradação microbiana e estabilidade da mistura B10 especialmente durante a estocagem.

5 – Agradecimentos

O financiamento desse projeto foi concedido pelo CNPq (Edital 40-2013 do Biodiesel); Recursos do *Office of Naval Research* (N62909-14-1-N18) nos EUA e CAPES com a bolsa-sanduíche. Agradecemos a Ipiranga Produtos de Petróleo S/A pelo fornecimento dos combustíveis e suporte técnico.

6 - Bibliografia

- Bento, F.M.; *Revista Biodiesel* **2010**, 47, 14.
- Passman, J.F.; *Biodeterior Biodegrad* **2012**, 81.
- Yemashova, N. A.; *Rev Environ Sci Biotechnol* **2007**, 6.
- Zhang, X.; *T Am Soc Agr Eng* **1998**, 41.
- Resolução ANP n° 50, de 23.12.2013 - DOU 24.12.2013
- Lei 13.263 - DOU 24.03.2016
- Bushnell L.D.; *J. Bacteriol* **1941**, 41.
- Cazarolli, J.C.; *Biodeterior Biodegrad* **2014**, 95.
- Aktas, D.F.; *Energ Fuel* **2010**, 24.
- Vieira, T.M.; Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. Artigos técnico-científico. Brasília-DF: 1 (2006).