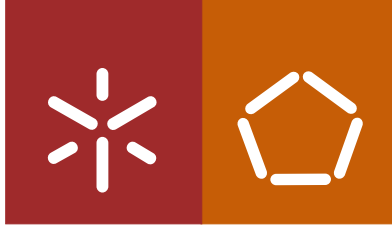


**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Maura Francisca da Silva Guimarães

**Produção de Triacilgliceróis por *Rhodococcus opacus* B4 a partir de aglomerados de cortiça contaminados com hidrocarbonetos**



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Maura Francisca da Silva Guimarães

**Produção de Triacilgliceróis por *Rhodococcus opacus* B4 a partir de aglomerados de cortiça contaminados com hidrocarbonetos**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica  
Ramo Tecnologia do Ambiente

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Professora Doutora Maria Alcina Alpoim Pereira**

outubro de 2014

**Autor:** Maura Francisca da Silva Guimarães

**E-mail:** maurafranciscasilva@gmail.com

**Título**

Produção de Triacilgliceróis por *Rhodococcus opacus* B4 a partir de aglomerados de cortiça contaminados com hidrocarbonetos

**Orientador:**

Doutora Maria Alcina Alpoim Pereira

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO/TRABALHO APENAS PARA EFEITO DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, 2014

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para que este trabalho fosse possível. Somos feitos de pedaços dos que passam na nossa vida, e este trabalho é reflexo disso.

Em primeiro lugar, agradecer à Corticeira Amorim por ter cedido amostras das cortiças utilizadas no trabalho que se apresenta.

Quero agradecer à minha orientadora, Dra. Alcina Pereira por toda a prestabilidade e apoio durante todo o trabalho, com incentivo, apoio, acompanhamento e ensinamentos. À Professora Dra. Madalena Alves, pela possibilidade de realização deste trabalho no Laboratório de Tecnologia Ambiental, e que assim me permitiu conhecer pessoas que me deram muito a aprender. À Rita Castro, por me ter acompanhado no dia-a-dia do trabalho, do nosso trabalho, por ser mais que co-orientadora, ser companheira de trabalho e amiga.

A todo o grupo de trabalho do Laboratório de Tecnologia Ambiental, pelo bom ambiente que estimulava o prazer de aprender, pelo companheirismo, pelo aprendizado, e pela positividade transmitida em momentos de maior insegurança. Todos, sem exceção, têm um pedacinho deles neste trabalho. Agradecer também à Eng. Madalena Vieira por todo o suporte técnico.

Aos meus amigos e família. Amigos que sempre ajudaram a *remar para a frente*, que me ajudaram e deram *força*. Família que sempre empurrou o *barco* para a frente quando ele parecia não se querer mover, em toda a minha vida.

Ao Nelson, por ser mais que um namorado, ser um amigo, um companheiro, um *ombro* e um *braço* quando a *força* falhava.

E por último, mas os mais importantes: à minha mãe e ao meu tio. Mãe que foi Mãe e Pai, Amiga, porque todas as minhas vitórias e derrotas não foram só minhas, foram nossas. Pelo esforço que sempre fez para me dar a oportunidade de dar todos os passos em frente, que me fizessem crescer em todos os aspetos. E ao meu tio, que apesar de há muito não estar aqui, ter sido sempre uma fonte de inspiração, de coragem, por me ensinar o que é acreditar em nós e lutar pelo que acreditamos.



## Resumo

O petróleo é a principal fonte de energia da atualidade. A sua distribuição é baseada numa complexa rede de transportes, sobretudo no mar, à qual estão associados inúmeros problemas ambientais resultantes da ocorrência de derrames. Uma das técnicas de contenção de derrames é a absorção com cortiça. Para tal, são utilizados grânulos de cortiça natural ou termicamente tratada, que poderão estar confinados em barreiras ou outro formato. Após a sua utilização, um dos possíveis métodos para alienação do material impregnado com hidrocarbonetos é incineração.

O trabalho que se apresenta pretende sugerir uma alternativa a esta incineração, transformando o resíduo em compostos de valor. Para tal foi avaliada a capacidade da *Rhodococcus opacus* B4 degradar hidrocarbonetos absorvidos no pó de cortiça (usada como absorvente) e a sua conseqüente conversão a triacilgliceróis (TAGs). A cortiça foi contaminada com um hidrocarboneto-teste, o hexadecano, e seguidamente posta em contato com *R. opacus* B4 durante 48h. Foram realizados diversos controlos e monitorizados o consumo de hexadecano e a produção de triacilgliceróis.

Os resultados obtidos demonstraram que a cortiça não interfere na ação da bactéria na captação de hexadecano e sua conversão em triacilgliceróis. Quando colocado na presença das cortiças contaminadas com hexadecano, *R. opacus* B4 produziu  $0,69 \text{ g} \pm 0,06 \text{ g}$  de TAG por grama de hexadecano consumido usando cortiça termicamente tratada (CTT) e  $0,59 \text{ g} \pm 0,06 \text{ g}$  usando cortiça natural (CN). A biomassa resultante apresentou uma razão TAGs/biomassa (p/p) de  $0,60 \pm 0,06$  na amostra com cortiça natural e  $0,97 \pm 0,04$  na amostra com cortiça termicamente tratada. No controlo feito sem a presença das cortiças, só com hexadecano no meio, atingiu  $0,47 \text{ g}$  TAGs por g de biomassa. Quanto à composição dos ácidos gordos, em todos os ensaios, o predominante foi o ácido palmítico (60%-70%, p/p).



## Abstract

Oil is the main source of energy today. The distribution is based on a complex transport network, especially at sea, associated with numerous environmental problems resulting from the occurrence of oil spills. One of the solutions for spill containment is absorption with cork. In order to achieve this, natural or heat-treated cork is used in booms or other confined material. A possible solution for the disposal of the absorbent impregnated with hydrocarbons is incineration.

This work intends to propose an alternative to incineration, transforming the residue into compounds of value. For this purpose, it was evaluated the ability of *Rhodococcus opacus* B4 to degrade hydrocarbons absorbed in cork powder (used as the absorbent), and its subsequent conversion to triacylglycerols (TAGs). The cork was contaminated with a hydrocarbon-test, hexadecane, and then brought into contact with *R. opacus* B4 for 48h. Various controls were performed in order to check the consumption of hexadecane and the production of triacylglycerols. These controls were regularly monitored.

The results showed that the cork does not interfere with the action of bacteria to capture the hexadecane and further convert it into triacylglycerols. When placed in contact with the hexadecane contaminated cork, *R. opacus* B4 yielded  $0.69 \text{ g} \pm 0.06 \text{ g}$  TAGs per gram of hexadecane consumed when using heat-treated cork and  $0.59 \text{ g} \pm 0.06 \text{ g}$  when using natural cork. The resulting biomass showed a TAG/biomass (w/w) ratio of  $0.60 \pm 0.06$  in the sample with natural cork and  $0.97 \pm 0.04$  in the sample with heat-treated cork. In the control assay, done without corks, with hexadecane in the medium, it was reached  $0.47 \text{ g}$  TAGs per gram of biomass. In all conditions tested, palmitic acid was the predominant fatty acid present in the produced TAGs (60% -70% w/w)





# Índice

Capítulo I: Introdução .....	1
1.1. Contextualização .....	1
1.1.1. Remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados .....	1
1.2. Utilização de cortiça para controlo de derrames de hidrocarbonetos .....	2
1.3. Bactérias hidrocarbonoclásticas .....	5
1.3.1. <i>Rhodococcus sp.</i> .....	5
1.3. Objetivo .....	9
Capítulo II: Materiais e Métodos .....	11
2.1. Inóculo e Meios de Cultura .....	11
2.1.1. Pré-Inóculo .....	11
2.1.2. Inóculo .....	11
2.2. Teste de Acumulação de Triacilgliceróis .....	12
2.3. Métodos Analíticos .....	13
2.3.2. Extração e análise de hidrocarbonetos .....	13
2.3.3. Extração e análise dos Triacilgliceróis .....	15
Capítulo III: Resultados e Discussão .....	19
3.1. Caracterização das Cortiças .....	19
3.2. Degradação do hexadecano .....	20
3.2. Acumulação de Triacilgliceróis .....	22
3.4. Composição em Ácidos Gordos dos Triacilgliceróis .....	24
Capítulo IV: Conclusão e Perspetivas Futuras .....	25
Bibliografia .....	27
ANEXOS .....	31
ANEXO I: Descrição de meios de cultura e soluções utilizadas .....	31
ANEXO II: Curva de Calibração para Análise por Cromatografia Gasosa .....	32
ANEXO III: Curvas de Calibração para Ácidos Gordos de Cadeia Longa .....	33



## Índice de Tabelas

TABELA 1.1: COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS POR PESO SECO DAS CÉLULAS DE DIFERENTES CULTURAS DE <i>RHODOCOCCUS</i> EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	8
TABELA 3.1: COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS DAS CORTIÇAS .....	19
TABELA 3.2: CONSUMO DE HEXADECANO PELO R. <i>OPACUS</i> B4 NOS ENSAIOS EFETUADOS COM CORTIÇA IMPREGNADA COM HEXADECANO (B4.CTT.C16 E B4.CN.C16),SEM CORTIÇA (B4.C16) E SEM ADIÇÃO DE HEXADECANO (B4.CTT E B4.CN).. OS DADOS APRESENTADOS SÃO O RESULTADO DA MÉDIA ENTRE RÉPLICAS.....	21
TABELA 3.3: DADOS DE TAGS PRODUZIDOS POR HEXADECANO CONSUMIDO.....	24
TABELA 3.4: PROPORÇÃO RELATIVA DE ÁCIDOS GORDOS NOS ÁCIDOS GORDOS TOTAIS CONSTITUINTES DOS TRIACILGLICERÓISDAS DIFERENTES AMOSTRAS .....	25
TABELA A1.: COMPONENTES DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS E RESPECTIVAS QUANTIDADES. VOLUME TOTAL DE MEIO IGUAL A 1 LITRO.....	33
TABELA A2: EQUAÇÕES DAS RETAS DE CALIBRAÇÃO PARA A DETECÇÃO DE HEXADECANO.....	35
TABELA A3: EQUAÇÕES DAS RETAS DE CALIBRAÇÃO PARA CADA UM DOS ÁCIDOS GORDOS.....	37



## Índice de Figuras

FIGURA 2.1: CORTIÇAS UTILIZADAS, CORTIÇA NATURAL E CORTIÇA TERMICAMENTE TRATADA.....	12
FIGURA 3.1: PLACA DE TLC COM O PERFIL DE LÍPIDOS OBTIDOS NOS ENSAIOS EFETUADOS. PONTOS 1 E 8: PADRÕES NAS CONCENTRAÇÕES DESCRITAS NA SECÇÃO 2.3.3.2 (AG-ÁCIDOS GORDOS, TAG- TRIACILGLICERÓIS); 2: B4.CN.C16, 3: B4.C16.T0, 4: B4.C16, 5: B4.CTT.C16, 6: B4.CN E 7: B4.CTT.....	22



## Lista de Abreviaturas

<b>B4</b>	<i>Rhodococcus opacus</i> B4
<b>CTT</b>	Cortiça Termicamente Tratada
<b>CN</b>	Cortiça Natural
<b>C16</b>	Hexadecano
<b>t0</b>	Tempo final da fase de inóculo/Tempo inicial da fase de acumulação
<b>Tf</b>	Tempo final da fase de acumulação
<b>TAG</b>	Triacilglicerol
<b>TSB</b>	<i>Tryptic Soy Broth Medium</i>
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colónia (microbiologia)
<b>DO</b>	Densidade Óptica
<b>C/N</b>	Razão carbono azoto
<b>GC</b>	Cromatografia Gasosa
<b>PI</b>	Padrão Interno
<b>C11</b>	Undecano
<b>FID</b>	<i>Flame Ionization Detetor</i>
<b>TLC</b>	<i>Thin Layer Chromatography</i>
<b>AGCL</b>	Ácido Gordo de Cadeia Longa
<b>AGCM</b>	Ácido Gordo de Cadeia Média
<b>C6:0</b>	Ácido Capróico
<b>C7:0</b>	Ácido Heptanóico
<b>C8:0</b>	Ácido Caprílico
<b>C10:0</b>	Ácido Cáprico
<b>C12:0</b>	Ácido Laurico
<b>C14:0</b>	Ácido Mirístico
<b>C15:0</b>	Ácido Pentadecanóico
<b>C16:0</b>	Ácido Palmítico
<b>C16:1</b>	Ácido Palmitoleico
<b>C17:0</b>	Ácido Margárico
<b>C17:1</b>	Ácido Heptadecenóico
<b>C18:0</b>	Ácido Esteárico
<b>C18:1</b>	Ácido Oleico
<b>C18:2</b>	Ácido Linoleico
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloreto de Amónia
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	Sulfato de Magnésia heptahidratado
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de monopotássio
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnésio



<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de Sódio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato disódico
<b>UFCs</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>CQO</b>	Carência Química de Oxigênio

## Capítulo I: Introdução

### 1.1. Contextualização

O petróleo é a matéria-prima mais utilizada como fonte de energia na atualidade. Sucintamente, pode ser descrito como uma mistura complexa de hidrocarbonetos, tendo como composição base 30% de parafinas cíclicas, 30% de compostos aromáticos, 16% de parafinas ramificadas, 14% de parafinas simples e 10% de resinas e asfaltenos (GalpEnergia, 2011). Esta matéria-prima resulta da decomposição de matéria orgânica, num processo que demora milhões de anos. A matéria orgânica depositada vai sendo pressionada por camadas superiores de matéria que se vão sobrepondo. (GalpEnergia, 2011).

Apesar de as energias alternativas, sobretudo as renováveis, ganharem cada vez mais espaço, a maquinaria industrial ainda é fundamentalmente adaptada ao uso de combustíveis provenientes da refinação do petróleo. Como a extração do petróleo só é economicamente viável em determinadas regiões do planeta, há necessidade de efetuar a sua distribuição; esta é feita com base numa rede complexa de transporte, que acarreta riscos, sobretudo ambientais. Estima-se que, por ano, cerca de 5 milhões de toneladas circulem pelos mares em todo mundo (Al-Majed et al., 2012).

No decurso destas rotas, ou até mesmo nas plataformas de extração petrolíferas em alto mar, é recorrente ocorrerem derrames de hidrocarbonetos. Estes derrames têm um profundo impacto ambiental, sobretudo nos ecossistemas. A resposta é tão eficiente quanto mais rápida for. Logo após um derrame a mancha propaga-se rapidamente e processos como a evaporação, emulsificação, foto-oxidação e dispersão ocorrem quase de imediato (Al-Majed et al., 2012).

#### 1.1.1. Remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados

Dada a proporção que estes acidentes têm, tanto em dimensão como em impacto ambiental, várias tecnologias foram desenvolvidas para a minimização, tanto quanto possível, dos seus efeitos. A aplicação de uma ou de um conjunto destas técnicas

## Introdução

é condicionada por factores naturais como as condições marítimas, correntes e marés, a velocidade e direção do vento, o clima da zona afetada. Estas condições podem diminuir a eficiência ou até mesmo inviabilizar a utilização de determinadas tecnologias (Al-Majed et al., 2012).

Os métodos de contenção/atuação mecânicos são essencialmente dois: barreiras flutuantes que limitam a propagação da mancha e *skimmers* que coam o óleo da água. Por norma estes são sucedidos de outras técnicas (Al-Majed et al., 2012).

Outros métodos podem ser distribuídos nas categorias de dispersantes, surfatantes e absorventes.

Os absorventes são os mais viáveis em linhas de costa e solo, tanto economicamente como em termos de eficiência. Estes podem ser naturais, sintéticos ou minerais podendo ser considerados como Universais (absorvem todos os líquidos) ou Apenas óleos (absorvem apenas hidrocarbonetos e seus derivados, sem absorver água). (Carmody et al., 2007).

Os dispersantes têm a sua eficiência muito diminuída em presença de climas quentes e pouco húmidos (Al-Majed et al., 2012).

Por fim, os surfatantes são os mais indicados em áreas de maiores dimensões (Al-Majed et al., 2012).

O método de biorremediação é baseado na utilização de bactérias com capacidades de degradar hidrocarbonetos – bactérias hidrocarbonoclásticas. As principais limitações deste método estão associadas a baixas concentrações de nutrientes como o fosfato, formas de azoto fixado e oxigénio, quando em presença de baixas temperaturas ou quando o óleo se encontra “afundado” na água (Al-Majed et al., 2012).

### 1.2. Utilização de cortiça para controlo de derrames de hidrocarbonetos

Portugal é o maior produtor de cortiça (Gil, 1997; Pintor et al., 2012). A cortiça é extraída do tronco e ramos do sobreiro sem danificar a árvore, normalmente no Verão e com uma periodicidade legal de 9 anos. Começa quando a árvore tem um perímetro de 0,7 metros e uma altura mínima de 1,3 metros (Gil, 2012). Esta cortiça, utilizada

essencialmente para a produção de rolhas, é cada vez mais aplicada em diferentes áreas, desde o vestuário até materiais de isolamento (Gil, 1997; Pintor et al., 2012).

A sua estrutura química tem sido estudada desde o século XVIII, apesar de ainda não ser completamente compreendida (Pintor et al., 2012). Sabe-se, no entanto, que a sua estrutura química está diretamente relacionada com a sua zona de origem e o clima correspondente, a genética da árvore, a sua idade e as condições de crescimento. A influência destas condições é fundamentalmente notada no conteúdo de suberina (Silva et al., 2005). De forma geral, a cortiça pode ser descrita como uma mistura complexa de ácidos gordos e álcoois orgânicos pesados, polissacáridos, taninas, lignina e alcanos (Domingues et al., 2005).

Uma das aplicações mais promissoras da cortiça é a biossorção. Nesta área, são utilizados grânulos de cortiça a solto ou então confinados em barreiras ou outro tipo de formato. Estes grânulos, normalmente com diâmetro inferior a 0,5 milímetros, têm diferentes características físicas, consoante a sua proveniência: pó de moagem quando resultantes da pré-moagem ou da granulação, puros quando provêm do polimento e corte da matéria-prima original para outros fins, pó resultante da finalização de rolhas e discos, e o resultante da produção de cortiça como material isolante. Até então, a mistura destes pós tem sido utilizada como combustível para caldeiras, devido ao seu elevado poder calorífico. As aplicações destes pós variam entre a mistura com colas, substrato agrícola, a utilização dos seus extrativos para a produção de químicos, entre muitas outras (Gil, 1997; Pintor et al., 2012; Silva et al., 2005).

A cortiça pode ser utilizada como biossorvente dos mais diversos compostos, desde metais pesados a compostos orgânicos. No caso destes últimos, a adsorção segue uma cinética de 2ª ordem: uma curva, inicialmente convexa, o que traduz o decréscimo da adsorção ao longo do tempo. A interação da cortiça com poluentes orgânicos, normalmente hidrofóbicos, é diferente da descrita com metais pesados, e pode ser explicada pelo domínio aromático da estrutura química da cortiça, sobretudo ao nível de conteúdo de lignina e suberina. As regiões hidrofóbicas destes dois componentes aumenta a capacidade dos poluentes hidrofóbicos difundirem na matriz da cortiça. O mecanismo de adsorção pode ser descrito em três passos:

- difusão do soluto no filme líquido envolvente às partículas de adsorvente,
- difusão do soluto nos poros da matriz, e,

## Introdução

- adsorção e dessorção das partículas do soluto na superfície adsorvente (Pintor et al., 2012).

Para poder aferir as suas qualidades como biossorvente, a cortiça deverá ser compreendida em todas as suas estruturas, macroscópicas e microscópicas. As células de cortiça são constituídas por uma parede celular primária, fina, constituída maioritariamente por lignina, uma parede secundária com suberina e ceras alternadas e uma terciária, constituída por uma fina camada de polissacáridos. As composições traduzidas em percentagens são cerca de: 40% de suberina, 22% de lignina, 18% de polissacáridos e 15% de extrativos. A estrutura da suberina na cortiça ainda não é totalmente compreendida, estando no entanto estimada como um poliéster, composta por ácidos gordos, ácidos fenólicos ligados por grupos éster. Quanto ao teor de lignina, este tem sido difícil de diferenciar dos compostos aromáticos provenientes da suberina (Silva et al., 2005).

Todas estas características descritas para a cortiça como biossorvente estimularam o estudo do seu comportamento no controlo de derrames de óleos, hidrocarbonetos e solventes. Para isso, a par do pó de cortiça natural, foi utilizado um pó de cortiça termicamente tratado, cujo tratamento visa aumentar a capacidade de absorção. O tratamento térmico, acima referido, é feito a temperaturas entre os 200 e 400 °C durante alguns minutos (Amorim Cork Composites, 2008). Testes efetuados aquando o lançamento do produto no mercado defendem ser possível a reutilização da cortiça através de centrifugação ou ação mecânica. Estes mesmos testes permitiram desenvolver fórmulas de cálculo que determinam a quantidade de granulado natural ou tratado para uma dada quantidade de óleo. Assim, estima-se que a cortiça natural seja capaz de absorver cinco vezes o seu peso em óleo, enquanto a cortiça termicamente tratada vê esta razão crescer para dez vezes, com um processo de sorção muito rápido cerca de 15 segundos para ambas. A mesma fonte assegura que a capacidade de absorção/adsorção é inversamente proporcional à granulometria do pó de cortiça utilizado. Um dos tratamentos atuais para este resíduo é a incineração (Amorim Cork Composites, 2008).

### 1.3. Bactérias hidrocarbonoclásticas

Os compostos presentes na indústria química, nomeadamente na indústria petrolífera, são altamente tóxicos para os microorganismos devido à sua capacidade de se ligarem à membrana celular, alterando a sua permeabilidade e conseqüentemente o metabolismo celular (Na et al., 2005; Torres et al., 2011). Somente bactérias altamente tolerantes a este tipo de ambientes conseguem sobreviver.

O primeiro microorganismo relatado com capacidade de sobrevivência nestes ambientes inóspitos foi o *Pseudomona putida* IH 2000, em 1869. Desde logo, a potencialidade biotecnológica deste tipo de microorganismos foi amplamente estudada, sendo sobretudo dirigida a organismos Gram-negativos, por serem aqueles que apresentam melhores mecanismos de adaptação a este tipo de ambientes, devido à membrana externa adicional que possuem. São descritos dois tipos de mecanismo nestas bactérias: o primeiro, diretamente relacionado com a diminuição da permeabilidade da membrana ao solvente, o segundo corresponde ao transporte de moléculas de solvente do interior da célula para o exterior através da bicamada fosfolípida. No entanto, apesar do favoritismo das bactérias Gram-negativas, cada vez mais estudos têm permitido descobrir estirpes Gram-positivas igualmente capazes de sobreviver neste tipo de ambientes: microorganismos pertencentes aos géneros *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* entre outros têm sido propostos alguns modelos de adaptação a ambientes tóxicos, como a indução da tensão geral, a produção de emulsionante do solvente orgânico ou a sua degradação ou a desativação enzimática. Por outro lado, foram também documentadas alterações morfológicas como resposta ao stress ambiental. No caso do género *Rhodococcus*, na presença de alcanos, foi verificado um aumento da saturação em ácidos gordos da membrana, tal como tinha já sido verificado em bactérias Gram-negativas (Torres et al., 2011).

#### 1.3.1. *Rhodococcus* sp.

O género *Rhodococcus*, como anteriormente foi mencionado, pertence ao grupo de bactérias Gram-positivas. São bactérias aeróbias, imóveis e não esporulantes. Diferentes espécies pertencentes a este género podem ser encontradas em ambientes tão díspares como o solo ártico e solos tropicais, no deserto e no fundo marinho (Alvarez

## Introdução

et al., 2013). É um vasto grupo, capaz de degradar uma também vasta gama de compostos com recalcitrância e toxicidade considerável. Esta capacidade está associada ao facto de terem uma fisiologia celular robusta e por terem diversos genes catabólicos no seu genoma. É por isso um forte candidato à biorremediação de locais contaminados. Conseguem catabolizar tanto pequenas como longas cadeias de alcanos, aromáticos e aromáticos heterocíclicos e policíclicos. A sua capacidade de degradação pode ser explicada pela aderência às gotículas de óleo através da sua superfície celular hidrofóbica com ácidos micólicos, cujos compostos alifáticos longos facilitam a captação dos compostos hidrofóbicos (Larkin et al., 2005; Martínková et al., 2009). Por outro lado, acredita-se que os alcanos são incorporados nas inclusões lípidicas sem a completa degradação do Acetil-coA (Álvarez et al., 1997). Aliada à sua ampla capacidade de degradação, este género tem ainda a capacidade de, através destes substratos produzir compostos de interesse, para diversas aplicações:

- Polihidroxicanoatos (PHAs), para a produção de plásticos convencionais,
- Triacilgliceróis (TAGs), utilizados na produção de biodiesel, cosmética, aditivos alimentares,
- Ceras (ECs) aplicadas na indústria farmacêutica, alimentar e cosmética (Martínková et al., 2009; Alvarez et al., 2013).

A acumulação de lípidos permite uma maior autonomia energética e uma autonomia temporária quando não estão disponíveis fontes de carbono. O género *Rhodococcus* é capaz de mobilizar os triacilgliceróis quando em abstinência de fonte de carbono, e a degradação destes composto fornece um rendimento energético maior, devido ao seu alto poder calorífico, quando comparados com hidratos de carbono, proteínas ou mesmo PHAs (Alvarez et al., 2013; Alvarez & Steinbüchel, 2002).

A acumulação destes compostos de reserva é incitada pelo excesso da fonte de carbono com a limitação de um dos compostos essenciais ao crescimento como o azoto, oxigénio ou fósforo. A limitação mais estudada é ao nível do défice de azoto, o que implica uma razão carbono/azoto superior à necessária para produção de biomassa (Alvarez & Steinbüchel, 2002).

Entre a diversa gama de compostos sintetizados e utilizados como reserva energética por membros deste género, a maior parte consiste em triacilgliceróis, seja qual for a fonte de carbono utilizada: acetato, gluconato, frutose, n-alcanos –

nomeadamente o hexadecano –, etc., devido ao facto de grande parte da codificação do genoma ser direccionada a enzimas envolvidas nas vias catabólicas de vários compostos (Alvarez et al., 2013; Silva et al., 2010; Wältermann et al., 2000).

A composição em ácidos gordos e a estrutura destes triacilgliceróis varia consoante a fonte de carbono utilizada. Por norma, a constituição é principalmente em ácidos gordos lineares de cadeia longa, saturados e insaturados, com catorze a dezoito carbonos (Alvarez, 2010).

Os substratos que intervêm no ciclo de Krebs como o succinato, acetato ou o citrato, e ácidos orgânicos de cadeia ímpar, como o propionato ou o valerato, resultam numa maior fração de ácidos gordos de cadeia ímpar quando comparados com a fração de ácidos gordos de cadeia ímpar acumulados através de substratos como a frutose e o gluconato. Quando os substratos são alcanos, como o hexadecano, o número de carbonos da cadeia de ácidos gordos está diretamente relacionado com o número de carbonos da cadeia do substrato. Substratos com carbonos pares não dão origem a ácidos gordos ímpares e vice-versa (Álvarez et al., 1997). A *tabela 1.1.* sumariza a composição em ácidos gordos nos triacilgliceróis reportada para várias espécies de *Rhodococcus* cultivados em diferentes fontes de carbono.

Das várias espécies estudadas, *Rhodococcus opacus*, em particular a estirpe PD630, revelou a maior capacidade para acumular triacilgliceróis a partir de vários substratos (Alvarez, 1996). Baseados nestes factos, estudos não publicados comprovaram a capacidade de outra estirpe desta espécie, *Rhodococcus opacus* B4, produzir também estes lípidos de reserva e como tal a escolha deste estudo recai sobre esta estirpe.

*Rhodococcus opacus* B4 foi isolada como tolerante a solventes orgânicos em solos contaminados com gasolina. É altamente hidrofóbica e com uma grande afinidade com hidrocarbonetos, tendo sido documentada a sua capacidade de sobrevivência em solventes orgânicos em cerca de 5 dias (Yamashita et al., 2007).



## Introdução

Tabela 1.1: Composição dos ácidos gordos por peso seco das células de diferentes culturas de *Rhodococcus* em diferentes fontes de carbono

	Fonte de Carbono	% Ácidos Gordos (p/p)	Proporção relativa de ácidos gordos (% p/p)									Referência Bibliográfica
			C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	
<i>Rhodococcus ruber</i>	Acetato (0,6%)	24,0										(Álvarez et al., 1997)
	Citrato (0,3%)	28,0										
	Glucose (1%)	19,0	v	2,8	-	35,2	13,8	-	8,2	5,1	34,9	
	Hexadecano (0,1%)	26,0	4,5	12,0	6,3	65,7	11,5	-	-	-	-	
	Pentadecano (0,1%)	18,0										
	Valerato (0,2%)	12,2	-	2,9	7,5	24,8	6,4	24,1	20,4	-	13,9	
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Gluconato (1%)	21,0	v	5,6	2,8	20,4	17,6	15,7	7,4	11,1	19,4	(Álvarez et al., 1997)
	Hexadecano (0,1%)	17,6	v	12,7	2,5	49,4	34,5	-	-	-	-	
	Valerato (0,2%)	15,1	-	6,3	21,9	10,2	9,9	11,8	24,0	-	15,9	
<i>Rhodococcus opacus</i> PD 630	Acetato (0,6%)	31,0	v	1,9	11,4	34,8	4,0	16,8	12,5	5,7	12,9	(Álvarez et al., 1997; Alvarez & Steinbüchel, 2002; Kurosawa et al., 2010; Alvarez et al., 1996)
	Frutose (0,5%)	40,0	v	2,1	8,4	32,3	4,6	12,5	13,7	4,5	21,4	
	Glucose	38,4		1,9	5,6	27,7	10,8	8,7	15,9	4,8	24,7	
	Gluconato (1,5%)	76,0	0,8	4,3	6,3	25,7	9,5	12,3	15,4	3,5	22	
	Hexadecano (0,1%)	38,0	1,6	9,1	-	68,9	20,4	-	-	-	-	
	Heptadecano (0,1%)	28,0	-	-	37,7	-	-	35,1	25,3	-	-	
	Octadecano (0,1%)	39,0	v	4,7	-	41,7	1,4	-	-	14,3	37,9	
	Azeite (0,3%)	87,0	v	0,7	-	16,8	5,9	-	-	2,8	73,8	
	Pentadecano (0,1%)	39,0	-	-	80,1	-	-	-	-	-	-	
	Propionato (0,2%)	18,0	-	-	33,3	3,2	-	23,2	39,1	-	-	
<i>Rhodococcus sp</i> P14	Glucose			1,2	4	16,1	2,36	-	49,6	2,5		(Song et al., 2011)
	Óleo mineral			6,7	-	9,3	13,9	-	35,6	-	6,7	
<i>Rhodococcus fascians</i>	Glucose (1%)	3,8	v	9,0	-	34,0	v	-	-	15,4	41,6	(Álvarez et al., 1997)
	Hexadecano (0,1%)	18,1	v	13,0	-	46,3	40,7	-	-	-	-	
	Valerato (0,2%)	23,9	-	3,4	7,4	17,7	17,7	19,9	23,2	-	23,5	
<i>Rhodococcus opacus</i> MR22	Gluconato (1%)	48,0	v	2,0	4,5	26,3	8,5	8,1	17,8	6,5	32,8	(Álvarez et al., 1997)
	Hexadecano (0,1%)	43,0	v	8,2	1,3	49,1	41,4	v	-	-	v	
	Valerato (0,2%)	42,5	-	1,0	31,3	5,8	4,4	18,6	28,9	1,9	2,3	
<i>Rhodococcus sp</i> 602	Gluconato	71,2		1,7	3,1	30,2	7,8	10,9	8,9	17,5	19,9	(Silva et al., 2010)
	Benzoato	64,9		3,4	6,2	30,7	11,3	10,3	11,3	11,9	14,9	
	Hexadecano	22,3		16,3	-	51,4	32,3	-	-	-	-	
<i>Rhodococcus opacus</i> UFA4	Gluconato	73,0	0,8	7,1	1,6	47,1	17,8	v	v	18,8	6,4	(Alvarez & Steinbüchel, 2002)
<i>Rhodococcus aetherivorans</i> IAR1	Acetato	24,0		5,0		53,0	10,0	2,0		11,0	9,0	(Hori et al., 2009)
	Tolueno	24,0		5,0		45,0	v	8,0		12,0	27,0	

v: vestigial, - não detetado, em branco: sem informação

### 1.3. Objetivo

O resíduo resultante da absorção de hidrocarbonetos de petróleo em cortiça é atualmente incinerado. O trabalho que se apresenta pretende sugerir uma alternativa a esta incineração, transformando o resíduo em compostos de valor. Para tal recorre à biorremediação do dito resíduo com *Rhodococcus opacus* B4, uma estirpe bacteriana capaz de produzir lípidos de reserva, em particular triacilgliceróis, a partir de hidrocarbonetos. Os triacilgliceróis produzidos podem ser extraídos e usados para produção de biodiesel, ou, em alternativa, o resíduo rico em lípidos (biomassa+triacilgliceróis+cortiça) pode ser adicionado a digestores anaeróbios para aumento da produção de biogás.

## Introdução

## Capítulo II: Materiais e Métodos

### 2.1. Inóculo e Meios de Cultura

Nos ensaios efectuados foi utilizada uma cultura de *Rhodococcus opacus B4* proveniente do *National Institute of Technology and Evaluation*, identificada com o número 108011 (National Institute of Technology and Evaluation, 2004).

Para garantir uma boa qualidade das células, a cultura foi mantida por repicagem de colónias de 3 em 3 semanas, em meio 802 agar e TSB agar (Anexo I). Esta repicagem consistiu na recolha de 2 a 3 colónias, com uma hansa esterilizada, e a sua deposição numa nova placa pelo método “riscado”. Este processo foi realizado à chama, ou com garantia de condições de total esterilidade, sendo de evitar a existência de vapor de água nas placas. Depois das colónias repicadas e espalhadas na nova placa, estas foram colocadas inicialmente numa estufa a 30 °C e depois de significativamente crescidas, guardadas no frigorífico a cerca de 4 °C.

#### 2.1.1. Pré-Inóculo

O pré-inóculo de *Rhodococcus opacus B4* foi preparado por recolha de 2 a 3 UFCs bem individualizadas com uma hansa estéril e a sua deposição num matraz com 50 mL de meio 802 estéril (Anexo I). O crescimento da cultura, numa incubadora com agitação orbital de 150 min<sup>-1</sup>, a 30 °C, foi de seguida acompanhado através da leitura frequente da densidade óptica (DO), a um comprimento de onda de 600 nm, até atingir um valor de aproximadamente 4 (após cerca de 48 horas), indicativo de que a cultura se encontra a meio da fase exponencial.

#### 2.1.2. Inóculo

A cultura de pré-inóculo obtida foi transferida (em condições de assepsia) para um matraz com 50 mL de meio MS estéril (DO final de 0,1) contendo hexadecano (0,1%) e NH<sub>4</sub>Cl (250 g/L) numa razão C/N na ordem dos 3,7. A cultura foi de seguida colocada a crescer a 30 °C, 150 min<sup>-1</sup>, durante cerca de 150 horas, tempo ao fim do qual se encontra aproximadamente a meio da fase exponencial de crescimento. Findo este

período de crescimento, a cultura foi transferida para Falcons estéreis, centrifugada a 10 000 *g* e 4 °C durante 15 minutos e ressuspensa em solução de NaCl (0,9%). Este procedimento foi efectuado três vezes, sendo por fim a cultura ressuspensa em 5 mL de meio MS.

### 2.2. Teste de Acumulação de Triacilgliceróis

Neste trabalho, foram testados dois produtos absorventes: cortiça natural, CN, e cortiça termicamente tratada, CTT (Amorim Cork Composites, 2008) (*Figura 2.1*). Como contaminante modelo foi utilizado o hexadecano ( $C_{16}H_{34}$ ), usualmente utilizado como representativo da classe de hidrocarbonetos alifáticos constituintes do petróleo e seus derivados.

Os ensaios foram realizados em matrizes de 250 mL, com um volume de trabalho de 50 mL, em duplicado. Inicialmente, tendo em conta a capacidade absorvente de cada material (Amorim Cork Composites, 2008) pesaram-se para os respetivos matrizes as quantidades de cortiça branca e cortiça preta a ser colocadas em contato com o hexadecano, nomeadamente 0,01 g de cortiça branca e 0,005 g de cortiça preta para 50 mg de hexadecano (C16), de forma a obter uma concentração de 1 g/L de hexadecano no meio de cultura. Cerca de 24 horas após a adição do hexadecano, foi adicionado o meio MS contendo  $NH_4Cl$  (250 g/L) na quantidade necessária para manter uma razão C/N de 300 (condições de limitação de azoto), e por fim o inóculo de *Rhodococcus opacus* B4 (DO final de 0,6). Todo o procedimento foi efectuado em condições de assepsia.



Figura 2.1: Cortiças utilizadas, cortiça branca e cortiça preta .

Paralelamente, foram efetuados ensaios de controlo: i) sem cortiças, designado por B4.C16, ii) sem inóculo, designado por CB.C16 e CP.C16, e iii) sem hexadecano, designados por B4.CP e B4.CB.

Os matrizes foram colocados numa incubadora com agitação orbital de 150 min<sup>-1</sup>, a 30 °C, durante 48h. Findo este período, as amostras para análise do consumo do hexadecano foram acidificados a pH 2 com HCl 8M e as amostras para análise do conteúdo do triacilgliceróis nas células foram centrifugadas (10 000 g a 4 °C, 15 minutos) lavadas com água destilada e depois liofilizadas.

## 2.3. Métodos Analíticos

### 2.3.1. Carência química de oxigénio (CQO)

A carência química de oxigénio (CQO) foi determinada usando os *kits* de teste em cuvete Lck414 (Hach-Lange, Alemanha). Estas medições foram efetuadas em triplicado, utilizando os procedimentos descritos pelo fabricante.

### 2.3.2. Extração e análise de hidrocarbonetos

#### 2.3.2.1. Extração Líquido-líquido com funis de separação

O hexadecano presente no meio de cultura foi extraído com hexano, recorrendo a funis de separação. A escolha do solvente depende da substância a ser extraída. Sendo o hexadecano um hidrocarboneto alifático de cadeia simples, o solvente mais indicado é o hexano, por ser o solvente mais apolar conhecido. Como a concentração de hexadecano no meio não é homogênea, o conteúdo dos matrizes teve de ser sacrificado em cada análise. Após transferência do meio de cultura para o funil, os matrizes foram lavados com 7,5 mL de hexano que foi de seguida adicionado aos funis de separação. Os funis foram agitados vigorosamente durante 2 minutos e depois deixaram-se a repousar durante 5 minutos para que a fase orgânica se separasse da fase aquosa. Nas amostras em que se verificou a formação de emulsões, estas foram quebradas com a adição de 4,5 mg MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Sandra & David, 2004). Como o hexano é menos denso que a água, a fase orgânica contendo o hexadecano fica na parte superior do funil. Esta foi cuidadosamente retirada com auxílio de uma pipeta de Pasteur, repetindo-se a processo

## Materiais e Métodos

de extração mais duas vezes com igual volume de hexano (3 x 7,5 mL no total). As fases orgânicas recolhidas foram limpas em colunas Sep-Pak Florisil 6cc (Waters, EUA) num *Manifold* com vácuo. As colunas foram previamente equilibradas com 5 mL de hexano e no final da filtração voltaram a adicionar-se 5 mL de hexano. O solvente foi de seguida evaporado e as amostras ressuspensas em 1 mL de hexano e guardadas no congelador até análise por Cromatografia Gasosa (Toffoli & Frasco, 2010).

### 2.3.2.2. Análise por Cromatografia Gasosa (GC)

A análise foi efetuada injetando 1 µL de amostra no equipamento *Varian 3400* (Varian Inc. USA), com detetor FID, com uma coluna *Varian VF1* 15m × 0,25 mm × 0,25 µm (Varian, Holanda).

A temperatura da coluna foi fixada a 60 °C, a do injetor a 285 °C e a do detetor a 300 °C. Utilizou-se um caudal de ar de 250 mL/min, um caudal de hidrogénio de 30 mL/min, um caudal de gás de arraste (hélio) de 1 mL/min e um caudal de azoto de 30 mL/min. O tempo de corrida foi de 16 minutos com 2 minutos de estabilização entre corridas. A temperatura manteve-se constante no primeiro minuto, crescendo nos seguintes a 8 °C por minuto até aos 170 °C.

Na análise por cromatografia gasosa é importante a utilização de um padrão interno, neste caso o undecano, para controlar a variabilidade inerente ao próprio equipamento. Assim, para a construção do padrão interno, adicionou-se 100 µL de undecano a um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume deverá ser perfeito com hexano. A 50 µL da amostra a analisar são adicionados 850 µL de hexano e 100 µL do padrão interno.

Os resultados são analisados pela razão das áreas dos picos do padrão interno e hexadecano, e conjuntamente com a curva de calibração (Anexo II), obtendo-se a concentração da amostra em hexadecano.

### 2.3.3. Extração e análise dos Triacilgliceróis

#### 2.3.3.1. Extração dos lípidos neutros

Depois de liofilizada, a biomassa foi ressuspensa em Clorofórmio-Metanol (2:1) – por cada 5 mg de biomassa utilizada é necessário 1 mL da mistura solvente. Este passo foi realizado em frasco de vidro, previamente passado por acetona; selado com parafilme e colocado à temperatura ambiente, a 140 rpm, durante 1 a 2 horas. O extrato foi depois passado por lã de vidro em pipetas de Pasteur previamente lavadas com Clorofórmio-Metanol (2:1, v/v). A amostra filtrada foi recolhida em frascos de vidro, previamente lavados e pesados, e deixada a evaporar (Folch et al., 1957).

Após evaporação, os frascos foram pesados. A diferença de valores entre a pesagem inicial e final resulta do conteúdo lipídico da amostra, cuja percentagem será calculada tendo em consideração a massa de biomassa utilizada.

#### 2.3.3.2. Separação em cromatografia de camada fina (TLC)

Os lípidos neutros produzidos pela biomassa foram separados em cromatografia de camada fina. O conteúdo lipídico foi dissolvido em 250 µL de Clorofórmio-Metanol (2:1, v/v) e aplicado na placa de TLC, constituída por sílica, em pontos marcados a 1 cm da margem inferior e distanciados em cerca de 1 cm. Nos pontos extremos foram colocados os seguintes compostos referência:

- Azeite– padrão para triacilgliceróis;
- Ácido Oleico– padrão para ácidos gordos livres, e
- Oleato de Oleílo – padrão para as ceras.

A placa foi de seguida colocada na câmara de TLC contendo 5 mL de hexano--dietil-éter-ácido acético (80:20:1, v/v). Deixou-se decorrer até que a frente do solvente atinge o sulco da placa (marcado a cerca de 8 cm da zona de aplicação), retirou-se o resto de solvente da câmara, e colocou-se iodo sólido. Após cerca de 10 a 15 minutos, a placa de TLC está completa com a coloração das manchas dos compostos da mistura (Wältermann et al., 2000).



2.3.3.3. Determinação do conteúdo de Triacilgliceróis

A quantificação dos triacilgliceróis foi efetuada através da raspagem da zona de manchas correspondentes aos TAGs na placa de sílica. O resíduo resultante foi transferido para uma pipeta de Pasteur contendo lã de vidro e os TAG eluídos com clorofórmio para um frasco previamente pesado. A amostra foi então deixada a evaporar e a quantidade de TAGs extraídos determinada por pesagem do frasco. Após esta determinação, as amostras são processadas para análise da sua composição de ácidos gordos (Santala et al., 2011).

2.3.3.4. Análise dos Ácidos Gordos de Cadeia Longa

A análise da composição de ácidos gordos dos triacilgliceróis é efetuada por cromatografia gasosa após digestão das amostras. As amostras resultantes da raspagem de TLCs e filtradas em lã de vidro, descrito no ponto anterior, foram ressuspensas em 1,5 mL de clorofórmio e colocadas em tubos próprios para a plataforma de digestão. A estes foram adicionados 3 mL de uma solução de ácido sulfúrico-metanol (15:85, v/v) e 1,5 mL de uma solução de padrão interno contendo ácido pentadecanóico (C15:0) e ácido heptanóico (C7:0) em clorofórmio, ambos numa concentração de 1 g/L. Os tubos foram colocados na plataforma de digestão a 100 °C durante 3,5h. Concluindo-se esta fase, adicionaram-se 1,5 mL de água ultrapura (após arrefecimento) e transferiu-se para *vials* rolhados e encapsulados que são colocados ao contrário durante cerca de 30 minutos. Após ser visível a clara separação de fases, extraiu-se a fase orgânica (inferior) com auxílio de uma seringa – esta fase deverá corresponder a um volume de cerca de 2 mL. A fase orgânica recolhida foi colocada em *vials* de cromatografia aos quais se adicionou uma pequena porção de tiosulfato de sódio, foram vortexados, e transferiu-se para novos *vials* de cromatografia, evitando transferir o tiosulfato de sódio (Brandl et al., 1988).

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa, injetando-se 1 µL de amostra, no equipamento *Varian 3800* (Varian Inc. USA) com injetor automático, com uma coluna *Trb-Wax* 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Teknokroma, Espanha). O hélio, gás de arraste, foi mantido a um caudal ininterrupto de 1 mL/min, com um caudal de azoto de 30 mL/min, com um caudal de ar sintético a 250 mL/min, e o de hidrogénio a 30

mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C nos dois primeiros minutos da corrida, até aos 225 °C numa razão de 10 °C por minuto, durante 10 minutos. As temperaturas do injetor e detetor foram colocadas a 220 e 250 °C respetivamente.

Os resultados foram analisados tendo em conta as curvas de calibração para cada ácido gordo que se pretende analisar (Anexo III).

## Materiais e Métodos

## Capítulo III: Resultados e Discussão

### 3.1. Caracterização das Cortiças

As cortiças utilizadas ao longo deste trabalho, CN e CTT, foram caracterizadas qualitativamente, em termos de composição em lípidos neutros, nomeadamente ácidos gordos livres, ceras e triacilgliceróis. Ambas apresentaram uma maior incidência de mancha na placa de TLC ao nível dos ácidos gordos livres, mais densa na cortiça branca que na preta, sendo a mancha ao nível dos triacilgliceróis relativamente ténue e a das ceras praticamente ilegível. A cortiça natural apresentou uma razão de massa de TAGs/massa de cortiça de 0,072 e a cortiça termicamente tratada de 0,091. Foi também analisada a sua composição em ácidos gordos (*tabela 3.1.*). Verificou-se que as duas cortiças têm composições similares tanto em ácidos gordos como na proporção dos mesmos, exceto em ácido oleico, apenas presente na cortiça natural. Todos os ácidos gordos são de cadeia par e média, excepto o ácido mirístico (cadeia longa). De realçar que nenhuma das cortiças tem ácido palmítico.

Foi também avaliada a sua fração orgânica através de testes de Carência Química em Oxigénio (CQO) (*secção 2.3.1*). Para este parâmetro, a cortiça natural apresentou uma CQO de 0,55 mg /mg de cortiça, e para a cortiça termicamente tratada esta razão é de 0,45 mg /mg de cortiça.

Tabela 3.1: Composição em ácidos gordos das cortiças

Amostra	Proporção relativa de Ácidos Gordos (%p/p)							
	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1
<b>Cortiça Natural</b>	16,6	29,6	17,9	13,1	-	-	-	22,8
<b>Cortiça Termicamente Tratada</b>	20,5	37,5	24,4	17,6	-	-	-	-

-: não detetado

### 3.2. Degradação do hexadecano

A detecção do hexadecano presente no meio de cultura permite analisar o seu consumo por parte da *R. opacus* B4. Para avaliar possíveis interferências das cortiças na extração do hexano para análise, o conteúdo dos matrizes contendo apenas cada uma das cortiças e hexadecano (1g/L, previamente impregnado na cortiça), designados por CN.C16 e CTT.C16, foi analisado no início do ensaio (tempo zero). Para a cortiça natural (CN) verificou-se que cerca de  $15,75 \% \pm 3,38 \%$  do hexadecano adicionado não era recuperado no processo de extração ao passo que para a cortiça termicamente tratado (CTT) a retenção era insignificante ( $2,50 \% \pm 3,24 \%$ ). A diferença entre as taxas de retenção das cortiças poderá ser explicada, em parte, pela maior porosidade apresentada pela cortiça termicamente tratada, devido ao processo de aquecimento (Pintor et al., 2012), que como tal apresentar menores limitações difusionais. Análises efetuadas no fim do ensaio, após 48 horas de incubação, demonstraram não haver alteração na quantidade de C16 detetada nestes matrizes.

Através da análise do conteúdo dos ensaios B4.CN e B4.CTT (sem hexadecano) no tempo inicial verificou-se a presença de pequenas quantidades de hexadecano, provenientes do inóculo. Estudos sugerem que as inclusões lípidas das bactérias hidrocarbonoclásticas são uma mistura complexa de lípidos neutros e substrato não modificado (Alvarez et al., 1996). No entanto, a maior parte deste hexadecano deverá estar concentrado no meio de cultura, entre as células. A alta hidrofobicidade da parede celular é responsável pela floculação das células em meios com hidrocarbonetos (Alvarez et al., 1996). No ensaio com cortiça natural foram detetados 0,20 g/L de hexadecano e no com cortiça termicamente tratada 0,26 g/L de hexano. Tendo em conta que a cortiça natural apresenta uma retenção de hexadecano de cerca de 16%, verifica-se que cerca de  $0,24 \text{ g/L} \pm 0,02 \text{ g/L}$  de hexadecano é transferido com o inóculo para cada matraz. Análises efetuadas no fim do ensaio, após 48 horas de incubação, demonstraram haver consumo do hexadecano residual presente em B4.CTT e B4.CN, mais acentuado neste último.

Na *tabela 3.2.* são apresentados os dados referentes ao consumo de hexadecano nas condições testadas.

Tabela 3.2: Consumo de hexadecano pelo *R.opacus* B4 nos ensaios efetuados com cortiça impregnada com hexadecano (B4.CTT.C16 e B4.CN.C16), sem cortiça (B4.C16) e sem adição de hexadecano (B4.CTT e B4.CN). Os dados apresentados são o resultado da média entre réplicas

Amostra	C16 <sub>inicial</sub> (g/L)	C16 <sub>final</sub> (g/L)	Consumo (%)
<b>B4.C16</b>	1,072 ± 0,003	0,081 ± 0,040	92,45 ± 7,39
<b>B4.CTT.C16</b>	0,924 ± 0,006	0,015 ± 0,002	96,04 ± 0,90
<b>B4.CN.C16</b>	0,812 ± 0,187	0,037 ± 0,007	93,94 ± 0,44
<b>B4.CTT</b>	0,256*	0,147 ± 0,003	42,55 ± 2,00
<b>B4. CN</b>	0,199*	0,004 ± 0,001	97,62 ± 0,37

\*substrato presente no inóculo

Analisando os dados da *tabela 3.2*, verifica-se uma degradação de hexadecano na ordem dos 93% em B4.C16, ensaio efetuado com hexadecano “livre” (no meio de cultura), 94% em B4.CN.C16 e 96% em B4.CTT.C16, ensaios efetuados com hexano impregnado em cortiça natural e termicamente tratada, respetivamente. Conclui-se assim que a impregnação do hexadecano nas cortiças não dificultou a sua acessibilidade para a *R. opacus* B4. A capacidade da *R. opacus* B4 produzir biosurfatantes (Lin et al., 2009; Whyte et al., 1999) poderá contribuir para o aumento da solubilidade do hexadecano, libertando-o da cortiça.

O aumento, apesar de ligeiro, do consumo de hexadecano nos ensaios com cortiça, relativamente ao ensaio sem cortiça, pode estar relacionado com interferências na extração do hexadecano do meio de cultura.

A diferença entre cortiças pode ser, em parte explicada pela granulometria da cortiça, já que a sua capacidade de absorção/adsorção é inversamente proporcional à granulometria apresentada pela cortiça (Amorim Cork Composites, 2008). Sendo a cortiça natural composta por grânulos significativamente maiores que a cortiça termicamente tratada, advêm daí parte das suas limitações, associado ao facto acima já referido de a cortiça termicamente tratada ter poros maiores que a cortiça natural (Pintor et al., 2012).

### 3.2. Acumulação de Triacilgliceróis

Na *figura 3.1* encontra-se ilustrada a placa de TLC com 10  $\mu$ L do extracto lipídico obtido nos ensaios efetuados. A amostra de B4.C16 no tempo inicial (t0) pretendeu aferir a quantidade de TAGs acumulados no inóculo utilizado. Esta amostra tem uma razão TAG/biomassa (p/p) média de  $0,34 \pm 0,15$ , tendo sido transferidos para cada matraz de teste 0,94 mg de TAGs. Quanto à amostra de B4. C16 no tempo final, apresentou uma razão TAG/biomassa (p/p) média de  $0,47 \pm 0,04$ .

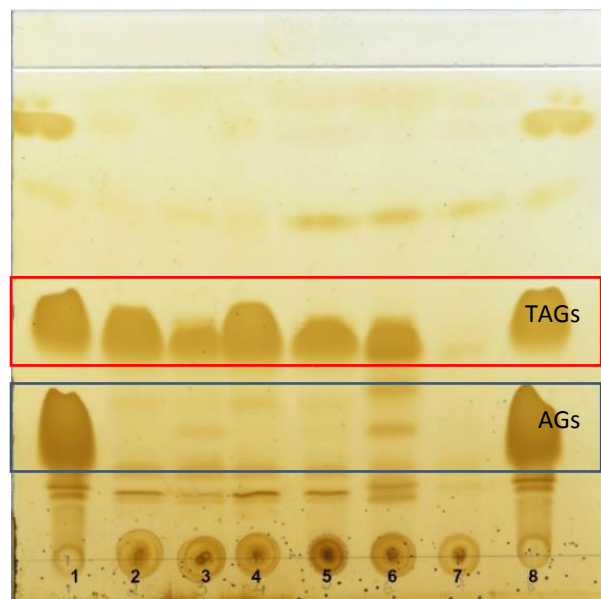


Figura 3.1: Placa de TLC com o perfil de lípidos obtidos nos ensaios efetuados. Pontos 1 e 8: padrões nas concentrações descritas na *secção 2.3.3.2* (AG-ácidos gordos, TAG-triacilgliceróis); 2: B4.CN.C16, 3: B4.C16.t0, 4: B4.C16, 5: B4.CTT.C16, 6: B4.CN e 7: B4.CTT.

Para B4.CN obteve-se  $0,25 \pm 0,03$  g TAGs/g biomassa e para B4.CTT,  $0,08 \pm 0,11$  g TAGs/g biomassa. Analisando estes resultados verifica-se que nestas situações a *R. opacus* B4 não só não consegue acumular TAGs, como consome os acumulados na fase de preparação do Inóculo. Constata-se então que *Rhodococcus opacus* B4, a par do género *Rhodococcus* em geral, é capaz de mobilizar TAGs quando incubadas em privação de fonte de carbono (Alvarez et al., 2013).

Para as amostras B4.CN.C16 e B4.CTT.C16 obteve-se uma razão TAGs/biomassa (p/p) de  $0,60 \pm 0,06$  e  $0,97 \pm 0,04$ , respetivamente.

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios efetuados com e sem cortiça, pode-se concluir que a cortiça não interfere na ação da bactéria na captação de hexadecano e sua conversão em triacilgliceróis.

Comparando a performance das duas cortiças, deduz-se os melhores resultados para a cortiça termicamente tratada, também aqui podem ser explicados pela maior largura dos poros deste tipo de cortiça, o que facilita o acesso ao hexadecano por parte da *R. opacus* B4 (Pintor et al., 2012).

A par desta análise, o produto liofilizado resultante das amostras B4.CN.C16 e B4.CTT.C16 foi analisado em termos de CQO tendo-se obtido  $1,51 \pm 0,41$  g/g liofilizado e  $1,65 \pm 0,1$  g/g liofilizado respetivamente. Considerando a conversão teórica de CQO em metano, 1 g de CQO corresponde a 0,35 L de CH<sub>4</sub> em condições normais de temperatura e pressão (Neves, 2009), pode-se aferir o metano produzido através da digestão do produto liofilizado como substrato. Assim, para o liofilizado B4.CTT.C16 obteve-se 0,58 L CH<sub>4</sub>/g liofilizado e para B4.CN.C16 0,53 L CH<sub>4</sub>/g liofilizado.

A *tabela 3.3.* apresenta os resultados obtidos em termos de rendimentos, triacilgliceróis produzidos por massa de hexadecano consumido. Analisando os dados da tabela verifica-se um maior rendimento de TAGs nas amostras com cortiça, B4.CTT.C16 e B4.CN.C16 em comparação com o valor obtido quando só presente hexadecano, B4.C16. Por forma a garantir que todos os TAGs detetados eram provenientes do metabolismo do hexadecano, paralelamente ao ensaio, foi desenvolvido um controlo no qual o *Rhodococcus opacus* B4 foi colocado a crescer (sem limitação de azoto) em cortiça como única fonte carbono. Este controlo comprovou a incapacidade da *R. opacus* B4 de utilizar compostos da cortiça para crescer, já que a DO que permitia acompanhar o crescimento não ultrapassou os 0,113 e 0,028 respetivamente.

Tabela 3.3: Dados de TAGs produzidos por hexadecano consumido

Amostra	Massa de C16 consumida (mg)	Massa de TAGs <sub>formada</sub> (mg)	m TAGs/m C16	
			Média	DP
B4.C16	47,50	22,16	0,47	
B4.CTT.C16	40,99	26,46	0,65	0,69 0,06
	51,31	37,46	0,73	
B4.CN.C16	46,02	25,59	0,56	0,59 0,04
	39,52	24,32	0,62	
B4.CTT	5,45	0,00	0,00	0,00 0,00
		0,00	0,00	
B4.CN	9,70	4,43	0,40	0,38 0,03
		4,01	0,36	

DP-desvio padrão



### 3.4. Composição em Ácidos Gordos dos Triacilgliceróis

A composição em ácidos gordos dos triacilgliceróis das amostras analisadas encontra-se descrita na *tabela 3.4*. Todas as amostras são do tempo final, após 48 horas de incubação, com exceção da primeira linha da tabela, B4.C16.t0.

A maior fração detetada corresponde ao ácido palmítico, como era expectável, dado que quando a fonte de carbono utilizada é um alcano, os ácidos gordos formados estão diretamente relacionados com o esqueleto de carbono da fonte, assim como foi o ácido gordo em maior proporção para todas as estirpes quando a fonte de carbono se tratava de hexadecano – *tabela 1.1* – (Álvarez et al., 1997). A fração deste ácido gordo é similar à fração detetada em culturas de *Rhodococcus opacus* PD630 e *Rhodococcus ruber* na mesma fonte de carbono (Alvarez & Steinbüchel, 2002; Álvarez et al., 1997) – *tabela 1.1*. O ácido palmitoleico foi também detetado na maioria das amostras, com a exceção da B4.C16.t0 e B4.CTT nas quais só foi detetado numa das réplicas, correspondendo a 16,2% e 8,2% respetivamente. O mesmo acontece com o ácido oleico e linoleico. O primeiro foi detetado numa das réplicas das amostras B4.C16.t0, B4.CTT.C16 e B4.CN, correspondendo a 35,2%, 20,7% e 21,5% respetivamente. Quanto ao ácido linoleico, tem uma fração de 7,8% em B4.C16.t0 e 2,7% em B4.CTT.C16.

Os ácidos gordos de cadeia média são detetados em quantidades vestigiais, correspondendo a menos de 10% dos Ácidos Gordos Totais. Assim, observa-se uma maioria de ácidos gordos de cadeia longa (C14:0 - C18:1), tal como o documentado na bibliografia, que sugere a especificidade do sistema Acil-coA transferase para ácidos de cadeia longa (Alvarez et al., 1996).

Tabela 3.4: Proporção relativa de ácidos gordos nos ácidos gordos totais constituintes dos triacilgliceróis das diferentes amostras

Amostra	Proporção relativa de Ácidos Gordos (% p/p)								
	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1
<b>B4.C16.t0</b>	V	-	-	V	2,6	67,0	*	*	*
<b>B4.C16</b>	V	-	*	V	3,7	61,8	21,6	8,5	2,8
<b>B4.CN.C16</b>	V	-	V	V	4,5	69,3	15,5	7,8	1,8
<b>B4.CTT.C16</b>	V	1,5	2,6	-	6,1	67,7	20,9	*	*
<b>B4.CN</b>	1,6	3,7	1,7	1,4	5,5	67,1	10,4	*	2,6
<b>B4.CT</b>	-	*	*	1,4	-	58,8	*	40,4	3,5

-: não detetado, v: vestigial, \*: não detetado em todas as réplicas da mesma amostra

## Capítulo IV: Conclusão e Perspetivas Futuras

Analisando todos os dados obtidos, verifica-se a viabilidade do que se propõe: valorização de aglomerados de cortiça contaminados com hidrocarbonetos. A razão de triacilgliceróis por biomassa obtidos vai de encontro aos dados já publicados para outras estirpes de *Rhodococcus*, sendo relativamente melhor. Estes triacilgliceróis podem ser encaminhados para diferentes indústrias, resultando numa clara valorização do produto até então incinerado. Quando comparadas as cortiças verifica-se melhores resultados na utilização da cortiça termicamente tratada que na cortiça natural.

Assim, a perspetiva futura mais imediata é aplicar o trabalho desenvolvido a um resíduo real, contendo uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Outra vertente interessante de estudo, é então, verificar a viabilidade da valorização energética, por Produção Biológica de Metano.

## Conclusão e Perspectivas Futuras

## Bibliografia

- Al-Majed, A. A., Adebayo, A. R. & Hossain, M. E., 2012. A sustainable approach to controlling oil spills. *Journal of Environmental Management*, pp. 213-227.
- Álvarez, H., Kalscheuer, R. & Steinbüchel, A., 1997. Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Nocardia* and effect on inhibitors and polyethylene glycol. *Fett/Lipid*, Volume 99, pp. 239-246.
- Alvarez, H. M., 2010. *Microbiology Monographs - Biology of Rhodococcus*. Vol 16 ed. Münster, Alemanha: Springer Verlag.
- Alvarez, H., Mayer, F., Fabritius, D. & Steinbüchel, A., 1996. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Arch Microbiol*, Volume 165, pp. 377-386.
- Alvarez, H. M. et al., 2013. Metabolism of triacylglycerols in *Rhodococcus* Species: insights from physiology and molecular genetics. *Journal of Molecular Biochemistry*, Volume 2, pp. 69-78.
- Alvarez, H. & Steinbüchel, A., 2002. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, Volume 60, pp. 367-376.
- Amorim Cork Composites, S. A., 2008. Portugal, Patente Nº PT 103492 B.
- Avila, A. F. et al., 2014. Nano-based systems for oil spills control and cleanup. *Journal of Hazardous Materials*, 272, pp. 20-27.
- Brandl, H., Goss, R., Lenz, R. & Fuller, R., 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(beta-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl Environ Microbiol*, Volume 57, pp. 1977 - 1982.
- Carmody, O., Frost, R., Xi, Y. & Kokot, S., 2007. Adsorption of hydrocarbons on organo-clays—Implications for oil. *Colloid and Interface Science*, 305, pp. 17-24.
- Ding, X. et al., 2014. A new magnetic expanded graphite for removal of oil leakage. *Marine Pollution Bulletin*, p. 1.
- Domingues, V., Alves, A., Cabral, M. & Delerue-Matos, C., 2005. Sorption behaviour of bifenthrin on cork. *Journal of Chromatography A*, Volume 1069, pp. 127-132.
- Evaluation, National Institute of Technology and, s.d. *Rhodococcus opacus B4*. [Online] Disponível em: <http://www.bio.nite.go.jp> [Acedido em 13 Março 2014].

## Bibliografia

- Folch, J., Lees, M. & Sloane, G. S., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 226, pp. 497-509.
- GalpEnergia, 2011. *Galp Energia*. [Online] Disponível em: <http://www.galpennergia.com> [Acedido em 10 Março 2014].
- Gil, L., 1997. Cork Powder Waste: an Overview. *Biomass and Bioenergy, Vol 13*, Volume 13, pp. 59-61.
- Gil, L., 2012. Cortiça. Em: *Ciência e Engenharia de Materiais de Construção*. Lisboa: ISTPress, p. 667.
- Hori, K., Abe, M. & Unno, H., 2009. Production of triacylglycerol and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by the toluene-degrading bacterium *Rhodococcus aetherivorans* IAR1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 108, pp. 319-324.
- Kurosawa, K., Boccazzi, P., Almeida, N. M. d. & Sinskey, A. J., 2010. High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production. *Journal of Biotechnology journal*, Volume 147, pp. 212-218.
- Larkin, M. J., Kulakov, L. A. & Allen, C. C., 2005. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic. *Biotechnology*, 16, pp. 282-290.
- Lim, T.-T. & Huang, X., 2007. Evaluation of hydrophobicity/oleophilicity of kapok and its performance in oily water filtration: Comparison of raw and solvent-treated fibers. *Industrial Crops and Products*, 26, pp. 125-134.
- Lin, T.-C. et al., 2009. Hydrocarbon degrading potential of bacteria isolated from oil-contaminated soil. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, Volume 40, pp. 580-582.
- Martínková, L. et al., 2009. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, Volume 35, p. 162–177.
- Na, K.-S. et al., 2005. Isolation and Characterization of Benzene-Tolerant *Rhodococcus opacus* Strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 99, p. 378–382.
- National Institute of Technology and Evaluation, 2004. *Dogan Project*. [Online] Disponível em: <http://www.nbrc.nite.go.jp> [Acedido em 30 novembro 2013].

- Neves, L., 2009. *Anaerobic Co-Digestion Of Organic Wastes*. Universidade do Minho, Braga: Tese de Doutoramento.
- Pintor, A. M. et al., 2012. Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review. *Water Research*, 46, pp. 3152-3166.
- Rouliá, M. et al., 2002. Dispersion and Sorption of Oil Spills by Emulsifier-Modified Expanded Perlite. *Spill Science & Technology Bulletin*, Volume 8, pp. 425-431.
- Sandra, P. & David, F., 2004. *A robust method for the determination of mineral oil in water samples*. Kortrijk, Bélgica: Waste Water, IET.
- Santala, S. et al., 2011. Improved Triacylglycerol Production in *Acinetobacter baylyi* ADP1 by Metabolic Engineering. *Microbial Cell Factories*, Volume 10, p. 36.
- Silva, R., Grossi, V., Olivera, N. & Álvarez, H., 2010. Characterization of indigenous *Rhodococcus* sp. 602, a strain able to accumulate triacylglycerides from naphthyl compounds under nitrogen-starved conditions. *Research in Microbiology*, Volume 161, pp. 198-207.
- Silva, S. P. et al., 2005. Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, Volume 50, pp. 358-365.
- Song, X. et al., 2011. Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, Volume 62, pp. 2122-2128.
- Toffoli, G. & Frasco, B., 2010. *Analysis of Extractable Petroleum Hydrocarbon Compounds (EPH) in Aqueous and Soil/Sediment/Sludge Matrices*, New Jersey: New Jersey Department of Environmental Protection.
- Torres, S., Pandey, A. & Castro, G. R., 2011. Organic solvent adaptation of Gram positive bacteria: Applications and biotechnological potentials. *Biotechnology Advances*, 29, pp. 442-452.
- Wältermann, M., Luftmann, H. & Baumei, D., 2000. *Rhodococcus opacus* strain PD630 as a new source of high-value single-cell oil? Isolation and characterization of triacylglycerols and other storage lipids. *Microbiology*, Volume 146, p. 1143-1149.
- Whyte, L. et al., 1999. Physiological Adaptations Involved in Alkane Assimilation at a Low Temperature by *Rhodococcus* sp. Strain Q15. *Environmental Microbiology*, Volume 65, pp. 2961-2968.

## Bibliografia

Yamashita, S. et al., 2007. Utilization of hydrophobic bacterium *Rhodococcus opacus* B-4 as whole-cell catalyst in anhydrous organic solvents. *Biotechnological products and Process Engineering*, 74, pp. 761-767.

## ANEXOS

### ANEXO I: Descrição de meios de cultura e soluções utilizadas

Os meios de cultura utilizados encontram-se descritos na *tabela A1*. No Caso do meio MS, o volume da Solução 4 depende da razão carbono-azoto necessária.

Tabela A1.: Componentes dos meios de cultura utilizados e respectivas quantidades. Volume total de meio igual a 1 litro

Meio	Componente	Quantidade
<b>802</b>	Polipeptona	10 g
	Extracto de levedura	2 g
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
	Agar	15 g
<b>TSB Agar</b>	TSB	30 g
	Agar	15 g
<u>Solução 1</u> V = 400 mL	Stock A	2,5 mL
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
	MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
	Hongl Solution	2 mL
<b>MS</b> <u>Solução 2</u> V = 200 mL	NaHCO <sub>3</sub>	0,5 g
	<u>Solução 3</u> V = 400 mL	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<u>Solução 4</u>	NH <sub>4</sub> Cl (250 g/L)	



## ANEXO II: Curva de Calibração para Análise do hexadecano por Cromatografia Gasosa

A curva de calibração para a concentração de hexadecano foi construída para possibilitar a análise do consumo do hidrocarboneto ao longo do tempo. Foram feitos doze padrões com concentrações entre os 25 mg/L e os 1600 mg/L. Como se verificou que uma só curva não seria linear, dividiram-se as concentrações em duas curvas de calibração, a primeira de 25 a 250 mg/L, a segunda dos 300 aos 1600 mg/L, cada uma com seis padrões de concentrações diferentes. Sendo o hexadecano um composto muito volátil, as amostras foram pesadas por forma a certificar as quantidades exatas em cada amostra. A massa a pesar foi estimada através da massa volúmica do composto, 0,773 g/mL. Às massas pesadas, foram adicionados 10 mL de hexano. Também o padrão interno foi pesado por ser muito volátil. Pretendia-se uma concentração que rondasse os 1,5 g/L. Para isso, com base na massa volúmica do undecano, 0,74 g/mL, estipulou-se uma massa por volta dos 80 mg de undecano para 50 mL de hexano. Os padrões foram analisados por cromatografia gasosa, e a 0,9 mL de padrão foram adicionados 0,1 mL de padrão interno.

As retas podem ser descritas da forma:

$$\frac{\text{Área do pico hexadecano}}{\text{Área do pico undecano}} = a \cdot \frac{\text{Concentração hexadecano}}{\text{Concentração undecano}} + b$$

Para a curva correspondente às concentrações mais baixas, foi feita a solução mais concentrada e partir dela diluições. Para as concentrações mais elevadas, as soluções foram feitas individualmente. As curvas e respectivas equações estão descritas na *tabela A2*.

Tabela A2: Equações das Retas de Calibração para a deteção de hexadecano

Gama de Concentrações	Equação da Reta	R <sup>2</sup>
25 a 250 mg/L	y = 1,0403x - 0,0246	0,9947
300 a 1600 mg/L	y = 0,7922x + 0,5024	0,9857

## ANEXO III: Curvas de Calibração para Ácidos Gordos de Cadeia Longa

Estas curvas baseiam-se em 6 padrões. O padrão inicial tem uma concentração de 1 g/L de cada um dos ácidos gordos, 7 de cadeia longa e 3 de cadeia média – ácido laúrico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmíticoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido capróico (C6:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0). Os cinco padrões restantes são feitos através de diluições do inicial, cujas concentrações são de 0,5 g/L, 0,25 g/L, 0,1 g/L, 0,05 g/L, 0,025 g/L. Os padrões são digeridos nas mesmas condições das amostras, *ponto 2.3.3.4*. Para cada ácido gordo foi construída uma curva independente. As equações das retas obtidas encontram-se na *tabela A3*. As equações das retas que se apresentam pretendem-se representar na forma:

$$\frac{\text{Área do pico do ácido gordo}}{\text{Área do pico do ácido gordo padrão}} = a \cdot \frac{\text{Concentração do ácido gordo}}{\text{Concentração do ácido gordo padrão}} + b$$

Importa referir, que na solução do padrão interno, o ácido hexanóico é o padrão para os ácidos gordos de cadeia média, e o ácido pentadecanóico é o padrão para os ácidos gordos de cadeia longa.

Tabela A3: Equações das Retas de Calibração para cada um dos Ácidos Gordos

Ácido Gordo	Equação da Reta	R <sup>2</sup>
Ácido Capróico	y = 1,9538x + 0,0012	0,9963
Ácido Caprílico	y = 1,1026x + 0,0015	0,9985
Ácido Cáprico	y = 1,2287x + 0,0019	0,9987
Ácido Laurico	y = 1,9464x + 0,0006	0,9982
Ácido Mirístico	y = 1,9878x + 0,0102	0,9970
Ácido Palmítico	y = 1,0234x + 0,0589	0,9954
Ácido Palmitoleico	y = 0,9401x – 0,0134	0,9987
Ácido Esteárico	y = 0,9648x + 0,0453	0,9948
Ácido Oleico	y = 2,0562 - 0,0188	0,9988
Ácido Linoleico	y = 1.4567x – 0,0205	0,9937