



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Aplicada

Culminação de Estudos II

Variante de Investigação

**Avaliação da biodegradação do diesel e biodiesel por fungos
Rhizopus ssp., *Mucor ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Penicillium ssp* e
Fusarium ssp através de bioindicador vegetal [*Vigna
unguiculata* (L.) Walp.]**



Autor: Rainel José Mangraça



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas
Licenciatura em Biologia Aplicada
Culminação de Estudos II
Variante de Investigação

**Avaliação da biodegradação do diesel e biodiesel por fungo
Rhizopus ssp., *Mucor ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Penicillium ssp.* e
Fusarium ssp. através de bioindicador vegetal [*Vigna
unguiculata* (L.) Walp.]**

Supervisores:

Prof. Doutor Eng. João Fernando Chidamoio
dr. Arlindo Chauque

Co-supervisores

Prof. Doutora Telma Magaia
dra. Vitoria Nhanombe

Autor: Rainel José Mangraça

Agradecimentos

Para conclusão deste curso e para elaboração deste trabalho muitas pessoas e instituições deram o seu precioso contributo. Por isso gostaria de endereçar o meu muito obrigado a todos abaixo citados e outros que contribuíram directa e indirectamente para que este trabalho fosse uma realidade

Aos supervisores Prof. Doutor Eng. João Fernando Chidamoio e dr. Arlindo Chauque, aos co-supervisores Prof. Doutora Telma Magaia e dra. Vitoria Nhanombe, ao dr. Santos Luis Mucave e ao licenciado José Luís Matlombe pelo apoio e motivação nos diferentes momentos desta investigação, assim como no fornecimento de material para realização do trabalho.

A Universidade Eduardo Mondlane no geral, em particular ao Departamento de Ciências Biológica da Faculdade de Ciências pelo apoio académico brindado durante o processo de formação.

A Faculdade de Engenharia ao Departamento de Engenharia Química por me dar a oportunidade de realizar o trabalho de pesquisa, que permitiu impulsionar as minhas capacidades investigativas.

Ao técnico Sr. Simião Silva Maluve e Sr. António Marcos Macanandza.

Aos meus companheiros do curso de Biologia Aplicada.

Aos meus pais, por sua companhia constante e acessória em temas académicos.

A Deus por me dar a oportunidade de progredir dia a dia e ir alcançando um a um os objectivos da vida.

Declaração de Honra

Declaro pela minha honra que este trabalho é da minha autoria e os resultados obtidos nunca foram publicados numa outra instituição, o seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas foram devidamente mencionadas nas notas e na referência bibliografia. Esta é a primeira vez que submeto para obter um grau académico numa instituição de ensino superior.

Maputo, Março de 2024

Assinatura

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature is written in a cursive style and reads "Rainel José Mangraça".

Rainel José Mangraça

Dedicatória

Aos meus pais por terem brindado apoio incondicional, por ser exemplo de fortaleza e perseverança na vida, porque muitas das minhas conquistas devo a vocês. As pessoas que conheci na universidade, pela amizade e apoio no transcurso da formação.

*O único dia fácil foi ontem, se quer paz prepara-te para a guerra, o treinamento deve ser tão forte para que a guerra pareça um descanso, não há obstáculos que não se possa vencer.
Se é visto lejos, acido por subir hombros de gigantes.*

(Autores desconhecidos)

(Isaac Newton)

Lista de abreviaturas

BV	Biodiesel vegetal
BG	Biodiesel de Gordura
BF	Biodiesel de fritura
DF	Diesel fóssil (comercial)
BVR	Biodiesel vegetal + substrato de fungo
BFR	Biodiesel de fritura + substrato de fungo
BGR	Biodiesel de gordura + substrato de fungo
DFR	Diesel fóssil + substrato de fungo
S.C	Sem contaminação
TAL	Taxa de assimilação líquida
PI	Período de indução
IAF	Índice de área foliar
TCC	Taxa de crescimento da cultura
TG	Taxa de germinação
His	Histidina
Asp	Asparagina
INE	Instituto Nacional de Estatística
ASTM D445	American Society for Testing and Materials
NaOH	Hidróxido de sódio
UEM	Universidade Eduardo Mondlane
IA	Índice de acidez
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
EN14214	Norma Europeia para combustíveis
EN14112	Norma Europeia para estabilidade oxidativa
CYP	Citocromo P ₄₅₀
NADPH	Nicotinamida de adenina de nucleótido

Resumo

Os combustíveis fósseis possuem um grande potencial de poluição do meio ambiente, causando impacto na saúde humana, na vida animal, nas florestas, na qualidade do solo e da água. Este trabalho teve como objectivo avaliar a biodegradação do diesel e biodiesel por fungos *Rhizopus ssp.*, *Mucor ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Penicillium ssp* e *Fusarium ssp* em solos contaminados com diesel e biodiesel através de um bioindicador vegetal. Trata-se de um estudo experimental laboratorial, de análise hipotético-dedutivo. As metodologias utilizadas estabelece as condições de obtenção das amostras de biodiesel, a determinação de parâmetros físico-químicos das amostras do diesel e do biodiesel, a determinação da estabilidade oxidativa das amostras, e as análises de fitotoxicidade baseadas na descrição da taxa de germinação das sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, na taxa de assimilação líquida, no índice de área foliar e a taxa de crescimento da cultura. Os dados foram obtidos pelos cálculos comparativos entre grupos de tratamentos e de correlação entre IAF e IP. Os resultados mostram, os valores amplamente variados entre as amostras de 0.0-0.96/h para BV, 0.0-3.53/h para BG, 0.0-5.30/h para BF e 0.0-25.08/h para DF como ordem de eficiência pelo método Rancimat. Nas análises de fitotoxicidade, As diferenças dos valores da mediana entre os tratamentos são maiores do que seria esperado ao caso, observou-se uma taxa germinativa 100% para S.C, 50% para BF, 25% para BV, 25% para BVR e 0% para os demais tratamentos no período de 14 dias, onde $p < 0.05$. Nas análises de crescimento de *Vigna unguiculata* (L.) Walp como bioindicador, foram observados valores máximos para TAL nos tratamentos DFR com $2.733 \text{ g.m}^{-2}.\text{semana}^{-1}$ por 30 dias e BV com $2.179 \text{ g.m}^{-2}.\text{semana}^{-1}$ por 60 dias; para IAF nos tratamentos BGR com 0.367 por 30 dias e BGR com 0.656 por 60 dias e para TCC apresentou flutuações nos tratamentos BFR, BVR e BGR com 0.419, 0.460 e $0.471 \text{ g.m}^{-2}.\text{semana}^{-1}$ respectivamente durante 30 dias até 60 dias foi observado incremento nos mesmos tratamentos. Os resultados mostraram alta eficiência na biodegradação das amostras do biodiesel, e os resultados de correlação de observados entre IAF e PI reforçam o facto das amostras do diesel serem resistentes ao processo de oxidação. Este facto está relacionado com o mecanismo interfacial de activação das enzimas, tipos de enzimas específicas ao substrato e os mecanismos catalíticos envolvidos.

Palavras-chave: Diesel, Biodiesel, Toxicidade, Fungos bolor de pão, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Lista de Figuras

Figura 1. Reacção química para produção do biodiesel transesterificação dos triglicéridos.	10
Figura 2. Reacção de transesterificação do óleo com álcool por etapas	11
Figura 3. Reacção de esterificação de ácido carboxílico	11
Figura 4. Mecanismo catalítico de hidrólise de ligações de éster catalisada por esterases e lípases	13
Figura 5. Mecanismo de oxidação de um n-alcano do diesel pelo sistema CYP.	14
Figura 6. Localização do Campus principal da Universidade Eduardo Mondlane e da Faculdade de Engenharia.	17
Figura 7. Viscosímetro de redwood com regulador de corrente	20
Figura 8. Aparelho de Rancimat modelo 743 Metronhm	22
Figura 9. Período de indução das diferentes amostras de combustíveis (BV, BG, BF e DF) obtidos pelo método Rancimat.....	26
Figura 10. Comportamento das amostras de combustíveis durante o período de indução até o ponto máximo de indução (A, B, C e D).	27
Figura 11. Taxa de germinação de sementes <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp por tratamento ao longo de 7 dias.	28
Figura 12. Taxa de germinação de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp por tratamento ao longo de 14 dias.	29
Figura 13. Índice de área foliar dos diferentes grupos de tratamentos durante 30 dias.....	31
Figura 14. Taxa de crescimento da cultura nos diferentes tratamentos durante 30 dias.....	32
Figura 15. Taxa de assimilação líquida nos diferentes tratamentos, durante 60 dias.	33
Figura 16. Índice de área foliar nos diferentes grupos de tratamento durante 60 dias.	34
Figura 17. Taxa de crescimento da cultura nos diferentes tratamentos durante 60 dias.....	35
Figura 18. Correlação entre índice de área foliar e período de indução das amostras diesel e biodiesel, (A) período de 30 dias e (B) período de 60 dias.....	36
Figura 19. Observação morfológica da raiz nos diferentes tratamentos no período de 60 dias.	37
Figura 20. Infecção de <i>Vigna unguiculata</i> pelo fungo <i>Erysiphe diffusa</i> nos diferentes tratamentos, (A) tratado com fungo e (B) tratado sem fungo.	38

Lista de Tabelas

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do óleo vegetal, fritura e de gordura animal.	25
Tabela 2. Propriedades físico-químicas das amostras do diesel e biodiesel.	25
Tabela 3. Taxa de assimilação líquida em $\text{g.m}^{-2}.\text{semana}^{-1}$ dos diferentes grupos de tratamento durante 30 dias.	30

Lista de anexos

Anexo 1. Parâmetros de crescimento fisiológicos e o período de indução.	54
Anexo 2. Resultados de estabilidade oxidativa	55
Anexo 3. Parâmetros de crescimento de <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp.	55

Índice

Resumo	VI
Lista de figuras.....	VII
Lista de anexos.....	VIII
1. Introdução	4
1.2 Justificativa da realização do estudo.....	7
2. Objectivos e hipóteses.....	8
2.1.1 Geral.....	8
2.1.2 Específicos	8
2. 2 Hipóteses.....	8
2.2.1 Hipóteses nulas	8
2.2.2 Hipóteses alternativas	9
3. Revisão bibliográfica	10
3.1 Combustíveis diesel e biodiesel	10
3.2 Lípases e o citocromo P ₄₅₀	11
3.3 Especificidade das enzimas.....	12
3.3.1 Regiões de especificidade.....	12
3.3.2 Quimioespecificidade	12
3.3.3 Enantioseletividade.....	13
3.4 Mecanismo catalítico de lípases e citocromo P ₄₅₀	13
3.5 Biodegradabilidade do diesel e biodiesel.....	14
3.6 A associação de planta e microrganismo frente a contaminação com diesel e biodiesel, efeitos em resposta fisiológica da planta	15
3.7 Substrato de fungos.....	15
3.8 <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp	16
4. Metodologia	17
4.1 Área de estudo.....	17

4.2 Materiais	18
4.2.1 Equipamentos	18
4.2.2 EPI.....	18
4.2.3 Vidraria.....	18
4.2.4 Reagentes.....	18
4.2.5 Matéria-prima	18
4.3.1 Síntese de biodiesel	19
4.3.2 Análises de propriedades físico-químicas	19
4.3.2.1 Viscosidade cinemática	19
4.3.2.2 Índice de acidez	20
4.3.2.3 Densidade e ácidos gordos livres.....	21
4.3.3 Estabilidade oxidativa	21
4.3.4 Avaliação da fitotoxicidade.....	22
4.3.4.1 Delineamento experimental.....	22
4.3.4.2 Ensaio de fitotoxicidade	23
4.3.4.3 Análise de crescimento vegetal	23
4.3.4.3 Análise estatística	24
5. Resultados e discussão.....	25
5.1 Resultados	25
5.1.1 Caracterização da matéria-prima	25
5.1.2 Obtenção do biodiesel e caracterização das amostras de biodiesel	25
5.1.3 Estabilidade oxidativa das amostras por rancimat	26
5.1.4 Taxa de germinação das sementes	27
5.1.5 Análise de crescimento	29
5.1.6 Correlação entre IAF e período de indução	35
5.2. Discussão de resultados	39
6. Conclusão limitações e recomendações.....	43
6.1 Conclusão.....	43
6.2 Limitações do estudo	44

6.3 Recomendações.....	44
7. Referência bibliográficas	45
8. Anexos	54

1. Introdução

O diesel é um combustível derivado do petróleo (ANP, 2019). É composto por hidrocarbonetos com cadeias com 8 a 16 de carbono com características tóxicas, inflamável e a sua destilação ocorre na faixa de 100 °C a 400 °C (PETROBRAS, 2023). A composição do diesel difere conforme o método de produção, a fonte do petróleo e os processos de destilação que resulta em combustível com propriedade diversas (Silva, 2021), no geral, o diesel é composto principalmente de 75% de parafina e 25% de aromáticos (Adeola *et al.*, 2021).

No geral, combustíveis fósseis possuem um grande potencial de poluição do meio ambiente, causando impacto na saúde humana, na vida animal, nas florestas, na qualidade do solo e da água (Hassan *et al.*, 2021; Solarin, 2020) devido as actividades relacionadas ao processo de extracção, transporte, processamento das fontes de energia não renováveis, acidentes de veículos de transporte de combustíveis (Khanafer *et al.*, 2017).

O lançamento sem tratamento dos combustíveis gera diversas alterações ambientais como a demanda química de oxigénio no solo e a demanda bioquímica de oxigénio na água, que forma películas de lípidos que impede a penetração da luz solar, altera a quantidade de oxigénio dissolvido no meio ambiente, aumenta a temperatura e a concentração de sólidos solúveis (Nascimento, 2019). Libertam também muitos compostos como óxidos de carbono, óxidos de enxofre, metano (CO_x , SO_x e CH) e fuligem (Hassan *et al.*, 2021).

Apesar da sua importância em todo mundo, deixa o meio ambiente poluído principalmente em África onde já atingiu níveis preocupantes. Foi relatado que derramamento do diesel pode levar a uma redução de 60% na segurança alimentar das famílias e foi capaz de reduzir o teor de ácido ascórbico nos vegetais até 36% e o teor da proteína bruta da mandioca em 40%, o que resultou no aumento de 24% na prevalência da desnutrição infantil (Adeola *et al.*, 2021).

Para minimizar este problema, duas vias alternativas estão sendo estudadas a saber o uso de técnicas de remediação que possibilitam a redução ou a eliminação de contaminantes do meio ambiente através de um tratamento natural que utiliza organismos e os seus derivados (Santos *et al.*, 2021) e a substituição de combustíveis fósseis por renováveis que seja ecologicamente amigável, que para além de ser produzida a partir de uma matéria-prima renovável também reduza emissão de gases que prejudicam o meio ambiente (Medeiros e Ramos, 2019).

Apesar das amostras de biodiesel serem obtidos a partir de fontes com maior apelo ecológico de alternativas renováveis, possui uma capacidade tóxica devido formação de compostos

secundários durante a biodegradação e observa-se a presença de terc-butil-hidroquinona após início da biodegradação (Tamada *et al.*, 2012).

A biorremediação constitui um conjunto de técnicas de tratamento destinadas a eliminar, neutralizar, imobilizar, confinar ou transformar elementos ou substâncias presentes no ambiente com a finalidade de alcançar estabilidade química do ambiente, essas técnicas podem ser aplicadas isoladas ou combinadas (Santos *et al.*, 2021; Lima citado por Soares, 2020).

Dentre as técnicas de biorremediação mais utilizadas, foi escolhida a bioaumentação para este trabalho pela significância ecológica, utilizada quando os microrganismos do meio ambiente não são capazes de degradar o contaminante uma vez que o derramamento de contaminante ao meio ambiente não pode ser completamente evitado (Fan *et al.*, 2012). Consiste na introdução de microrganismos exógenos com a capacidade comprovada de utilizar contaminante como fonte de energia ou de converter contaminantes em formas menos nocivas (Filho *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2020).

Para além da bioaumentação, existe a bioestimulação que visa elevar a actividade microbiana, com a finalidade de acelerar e aumentar o percentual de biodegradação de contaminante por meio da adição de uma fonte menos complexa de nutrientes, a sua eficácia depende da capacidade metabólica dos microrganismos endógenos (Filho *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2020).

Vários estudos fazem uso da bioaumentação baseado principalmente no uso de espécies de bactérias como é caso dos géneros *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., e *Stenotrophomonas* sp (Correa, 2021). Entre tanto, os fungos filamentosos são conhecidos por serem potências produtores de lípases com notáveis propriedades catalíticas principalmente as espécies dos géneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp que podem formar um consórcio a ser utilizado na bioaumentação (Rigo *et al.*, 2021).

Os fungos *Rhizopus* sp, *Mucor* sp *Aspergillus* sp, *penicillium* sp e *Fusarium* sp formam o chamado bolor de pão que pode infectar vegetais, animais ou o ser humano através do ar e dos alimentos contaminados por eles contendo micotoxinas e outros compostos bioactivos os quais são passíveis de biodegradação e biotransformação através de enzimas (Henning, 2015).

A biotransformação de substratos envolve a formação de substâncias com actividades biológicas capazes de degradar compostos orgânicos resistentes como dioxinas, corantes, insecticidas e outros, por isso acredita-se na sua viabilidade em minimizar o impacto em diferentes ambientes contaminados (Santos *et al.*, 2019).

O processo de avaliação da actividade enzimática no solo conforme Margesin *et al.*, (2002) baseia-se na utilização de métodos colorimétricos (Nakatani *et al.*, 2008). E, por se tratar de método baseado na comparação de cores, em função da faixa de comprimento de onda, é necessário equipamento, reagentes específicos e maior demanda de tempo para a sua realização (Azañero *et al.*, 2024). Por isso, torna-se necessário a utilização de espécies vegetais como bioindicador para avaliar o poder tóxico dos combustíveis e o efeito causado pela presença dos fungos.

Os ensaios de fitotoxicidade permitem avaliar o potencial tóxico das substâncias por meio de observação da germinação e de crescimento de espécies vegetais (Da Silva *et al.*, 2023). Os bioindicadores vegetais são amplamente utilizados devido à sua simplicidade, custo acessível e alta sensibilidade a compostos tóxicos (Da Silva *et al.*, 2023), como é o caso de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

A *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (feijão Nhemba) é uma espécie de cultivo muito importante nas regiões tropicais e subtropicais, observa-se tolerância à seca que está fortemente relacionado com a densidade das raízes e a profundidade do enraizamento (Cardona-Ayala *et al.*, 2014). Neste sentido, a utilização dessa espécie em experimento pode ser fundamental para avaliar a eficácia dos processos de tratamento de contaminantes (Da Silva *et al.*, 2023).

O presente trabalho propõe a avaliar a biodegradação do diesel e biodiesel por fungos *Rhizopus sp*, *Mucor sp*, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* e *Fusarium sp*, através de *Vigna unguiculata* como bioindicador de fitotoxicidade de modo a criar uma via alternativa sustentável que contribua para o processo de descontaminação de solos.

1.1 Problema de pesquisa

A grande ocorrência do processo de contaminação dos solos está directamente relacionado a substâncias lipossolúveis, como é o caso dos hidrocarbonetos, biocombustíveis e resíduos derivados de processos industriais que afectam o solo, que por sua vez sofre alteração seja ela bioquímica, química e física que pode resultar na redução da disponibilidade de substâncias nutricionais como gorduras totais, carboidratos e conteúdo proteico em espécies vegetais. Para além de alterar a biologia das populações de microrganismos podem causar mudanças na sua estrutura bioquímica e molecular que pode provocar alteração na relação entre espécies devido à alteração na taxa metabólica padrão.

Por outro lado, o método colorimétrico demanda maiores custos e depende de especialista qualificado, por ser necessário a utilização de equipamentos, reagentes específicos. Neste sentido, houve a necessidade de responder às seguintes perguntas: qual é o efeito dos fungos

Rhizopus ssp, *Mucor ssp*, *Aspergillus ssp*, *Penicillium ssp* e *Fusarium* sobre diesel e biodiesel nos solos contaminados recorrendo ao bioindicador vegetal?

1.2 Justificativa da realização do estudo

O trabalho tem como finalidade gerar uma via alternativa sustentável para recuperação de área contaminadas com diesel e biodiesel por meio da utilização da espécie de fungos *Rhizopus ssp*, *Mucor ssp*, *Aspergillus ssp*, *Penicillium ssp* e *Fusarium ssp* (bolor de pão), que contribua para o processo de descontaminação de solos visto que trata-se de substâncias lipossolúveis através de bioindicador vegetal.

A escolha das espécies fúngicas deve-se ao facto dos fungos dos géneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus* e *Penicillium* serem importantes e actualmente têm sido considerados fontes enzimas preferencialmente as lípases, isso porque, geralmente as lípases fúngicas não são nocivas a saúde humana (Rodrigues *et al.*, 2016). Para além de apresentar um potencial de produção em grande escala (Nascimento *et al.*, 2014), as lípases podem catalisar varias reacções que incluem esterificação, transesterificação, aminólise e tiotransesterificação em condições onde a água no meio é reduzida ou ausente (Oliveira, 2020).

A escolha da espécie vegetal de *Vigna unguiculata* (L.) Walp deve se ao facto da espécie ser importante fonte de proteínas consumida por populações das zonas rurais e urbanas, para além de ser fonte de emprego e renda nestas regiões, é uma componente importante da dieta alimentar e a sua importância está no alto conteúdo proteico, de fibras alimentares, de minerais e antioxidantes (De Oliveira *et al.*, 2021; Simplício, 2015).

2. Objectivos e Hipóteses

2.1 Objectivos

2.1.1 Geral

- Avaliar a biodegradação do diesel e do biodiesel por fungos *Rhizopus ssp.*, *Mucor ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Penicillium ssp* e *Fusarium ssp* através de bioindicador vegetal *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

2.1.2 Específicos

- Sintetizar amostras de biodiesel no laboratório
- Determinar propriedades físico-químicas e a estabilidade oxidativa das amostras do diesel e biodiesel;
- Comparar a taxa de germinação das sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp nos diferentes tratamentos nos períodos de 7 e 14 dias;
- Determinar a taxa de assimilação líquida, índice de área foliar e taxa de crescimento da cultura nos períodos de 4 e 8 semanas;
- Comparar a taxa de assimilação líquida, índice de área foliar e taxa de crescimento da cultura nos diferentes grupos de tratamentos nos períodos de 4 e 8 semanas;
- Correlacionar o período de indução das amostras do diesel e do biodiesel com o índice de área foliar dos tratamentos nos períodos de 4 e 8 semanas.

2. 2 Hipóteses

2.2.1 Hipóteses nulas

- A contaminação por diesel e o biodiesel não diminui a colonização e desenvolvimento do fungos *Rhizopus ssp.*, *Mucor ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Penicillium ssp* e *Fusarium ssp* no solo;
- A contaminação por diesel e biodiesel no solo não diminui o crescimento da planta de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, devido o stress causado pela presença do contaminante no meio;
- A inoculação do substrato de fungos no solo contaminado não melhora o stress hídrico, não melhora as trocas gasosas e não reduz a formação de um ambiente hidrofóbico nas plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, devido o stress causado pelo diesel e biodiesel.

2.2.2 Hipóteses alternativas

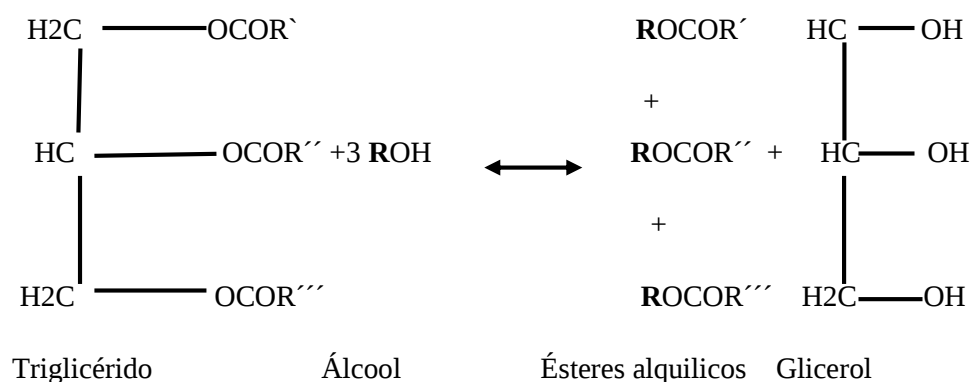
- A contaminação por diesel e o biodiesel diminui a colonização e desenvolvimento dos fungos *Rhizopus ssp.*, *Mucor ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Penicillium ssp* e *Fusarium ssp* no solo;
- A contaminação por diesel e biodiesel no solo diminui o crescimento da planta de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, devido o stress hídrico induzido pela presença do contaminante no meio;
- A inoculação do substrato dos fungos no solo contaminado melhorara o estado hídrico e as trocas gasosas e reduz a formação de um ambiente hidrofóbico nas plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, devido ao stress causado pelo diesel e biodiesel.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Combustíveis diesel e biodiesel

A composição do diesel difere conforme o método de produção, a fonte do petróleo e os processos de destilação que resulta em combustível com propriedade diversas (Silva, 2021). A composição de hidrocarbonetos presentes no óleo diesel possuem elementos como enxofre que participa na corrosão e aumento de emissão de materiais particulados, o oxigênio deixa mais instável termo-oxidativamente, aumenta a acidez e corrosividade do diesel, e o nitrogênio que causa instabilidade do diesel por reações de degradação (Zanão, 2019; Silva, 2021; Hassan *et al.*, 2021).

O biodiesel é um conjunto de ésteres monoalquílicos proveniente de óleo vegetal e gordura animal que pode substituir o diesel fóssil, capaz de criar um ambiente mais estável e desejável (Freitas, 2014), apresenta uma série de vantagens ambientais como ser livre de enxofre, compostos aromáticos, baixa emissão de monóxido de carbono e poluentes (da Silva Castro e Barañano, 2019; Dib, 2010). O biodiesel é constituído quimicamente por ésteres metílicos ou etílicos de ácidos gordos de cadeia longa, os quais são obtidos principalmente pela transesterificação dos triglicéridos com metanol ou etanol (Mendes, 2015; Ramos *et al.*, 2011).



Legenda: R' R'' R''' cadeias carbónicas com insaturações e R radical alquil de cadeia curta (metanol ou etanol) adaptado de Kawentar e Budiman, 2013.

Figura 1. Reacção química para produção do biodiesel transesterificação dos triglicéridos.

Existem cinco principais métodos de transesterificação: catálise alcalina, ácida, ácida-alcalina, enzimática e não enzimática (Ho *et al.*, 2014), o processo global de transesterificação é uma sequência de três reacções consecutivas e reversíveis como ilustra a figura 2. Nas quais o diglicerídeo e monoglicerídeo são formados como produtos intermediários (Ma e Hanna, 1999).

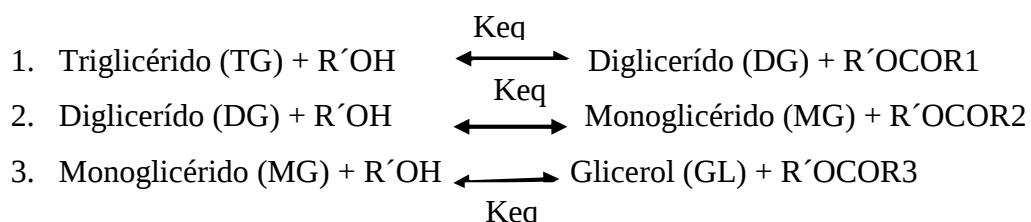


Figura 2. Reacção de transesterificação do óleo com álcool por etapas (Ma e Hanna, 1999)

Para teores de ácidos gordos livres maiores que 1 % esta estratégia se torna impraticável devido consumo excessivo de catalisador e há perda considerável do potencial de rendimento em biodiesel devido a formação de sabão que impede a separação final entre o biodiesel e o glicerol (Viera, 2011). Para este objectivo duas reacções são conduzidas sequencialmente, a reacção de esterificação dos ácidos gordos livres (Figura 3), que pode ser catalisada por ácidos de Bronsted ou Lewis e catalisadores básicos de Lewis ou por enzimas (Go *et al.*, 2016; Chai *et al.*, 2014; Viera, 2011) e reacção de transesterificação.

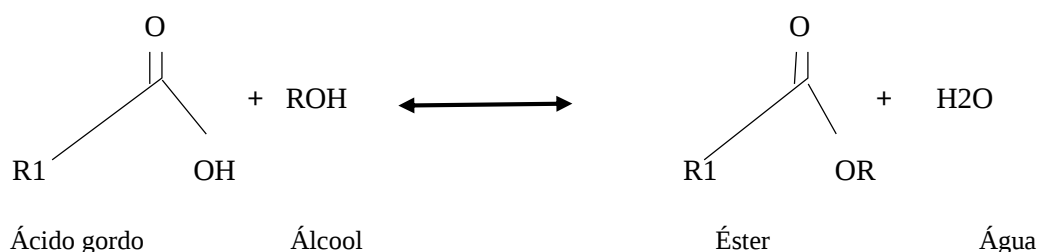


Figura 3. Reacção de esterificação de ácido carboxílico (Leão, 2009)

Estudos mostram a substituição de óleo diesel por biodiesel, como consequência há uma redução na emissão de monóxido de carbono e material particulado (Schultz, 2010). Alguns estudos têm demonstrado um aumento na emissão de óxido de nitrogénio nas amostras de biodiesel (Cardoso, 2011).

3.2 Lípases e o Citocromo P₄₅₀

As lípases (glicerol éster hidrólases) fazem parte das alfas/β-hidrólases, que possuem um padrão de dobramento característico. Existem dois grupos de enzimas estreitamente relacionadas que actuam em ligações de éster de ácidos carboxílicos, as lípases e as carboxilesterases (Sperb *et al.*, 2015), as lípases diferem das carboxilesterases em termos do fenómeno de activação interfacial, ou seja, as lípases catalisam a hidrólise de ésteres insolúveis em água com ácidos gordos de cadeia longa, igual ou superior 10 átomos de carbono, que

diferem das carboxilesterases, que são mais activas para ésteres solúveis em água com cadeia de ácidos gordos relativamente curtas, inferiores a 10 átomos de carbono (Ramos-Sánchez *et al.*, 2015). Estas enzimas possuem uma tampa na forma de alfa-hélice que bloqueia o acesso ao sítio activo, na presença de um substrato lipídico ou inibidor a tampa se adapta de forma a permitir o cesso ao sítio activo e ao mesmo tempo uma área hidrofóbica fica expostas, o que facilita a ligação da lípase a interface água-óleo (Cortez *et al.*, 2017).

Os fungos possuem sistemas enzimático hidrolítico complexo, além de possuir redes intracelulares que formam o xenoma que é constituídos por monooxigenases do Citocromo P₄₅₀ e das glutatonas transferases para lidar com uma vasta gama de contaminantes (Deshmukh *et al.*, 2016).

O citocromo P₄₅₀ serve de catalisador crucial para oxidação regional e estéreo-específica o que destaca a importância do citocromo P₄₅₀ no metabolismo de uma vasta gama de compostos endógenos e exógenos separados em isoformas, a citosólica e a mitocondrial encontrados em *Fusarium oxysporum* e em outros fungos (Deshmukh *et al.*, 2016).

3.3 Especificidade das enzimas

3.3.1 Regiões de especificidade

As enzimas podem ser específicas em relação a molécula ácida ou alcoólica do substrato (Cortez *et al.*, 2017), as lípases não específicas são aquelas que catalisam reacções em todos grupos hidroxilo em qualquer posição de forma aleatório, as lípases 1.3-específicas catalisam reacções apenas em grupos de hidroxilo primários de triglicéridos nas posições 1 e 3, entretanto, as lípases de ácidos gordos específicos apresentam uma acção específica na hidrólise de ésteres formados a partir ácidos gordos de cadeia longa com ligações duplas entre C-9 e C-10 (Oliveira, 2020).

3.3.2 Químioespecificidade

A químioespecificidade é capacidade das lípases em distinguir posição 1 e 3 no triglicérido, as lípases podem mostrar estéreo selectividade insignificante ou ser muito estéreo selectivo que pode variar de acordo com a estrutura do substrato e esta relacionado a liberação de ácidos gordos livres com maior comprimento ou grau de insaturação, para além de hidrolisar triacilglicerol, hidrolisam também diacilglicerol e monoacilglicerol (Cortez *et al.*, 2017).

3.3.3 Enantioselectividade

A catalise enzimática permite transferir ou criar centros quirais nas moléculas, assim como distinguir as formas enantioméricas, essa capacidade que as lípases possuem de distinguir os enantiomêros de uma mistura racêmica, varia de acordo com substrato que esta ligada a natureza do éster (Oliveira, 2020).

3.4 Mecanismo catalítico de Lípases e Citocromo P₄₅₀

O mecanismo de hidrólise ou de formação de ésteres é semelhante para as lípases e as protéases devido a semelhança estrutural entre o sítio activo destas enzimas (figura 4). O sítio activo das lípases é caracterizado por uma tríade composta por serina, histidina e resíduo de ácido (ácido aspártico ou glutâmico) (Vaz e Choupine, 2012).

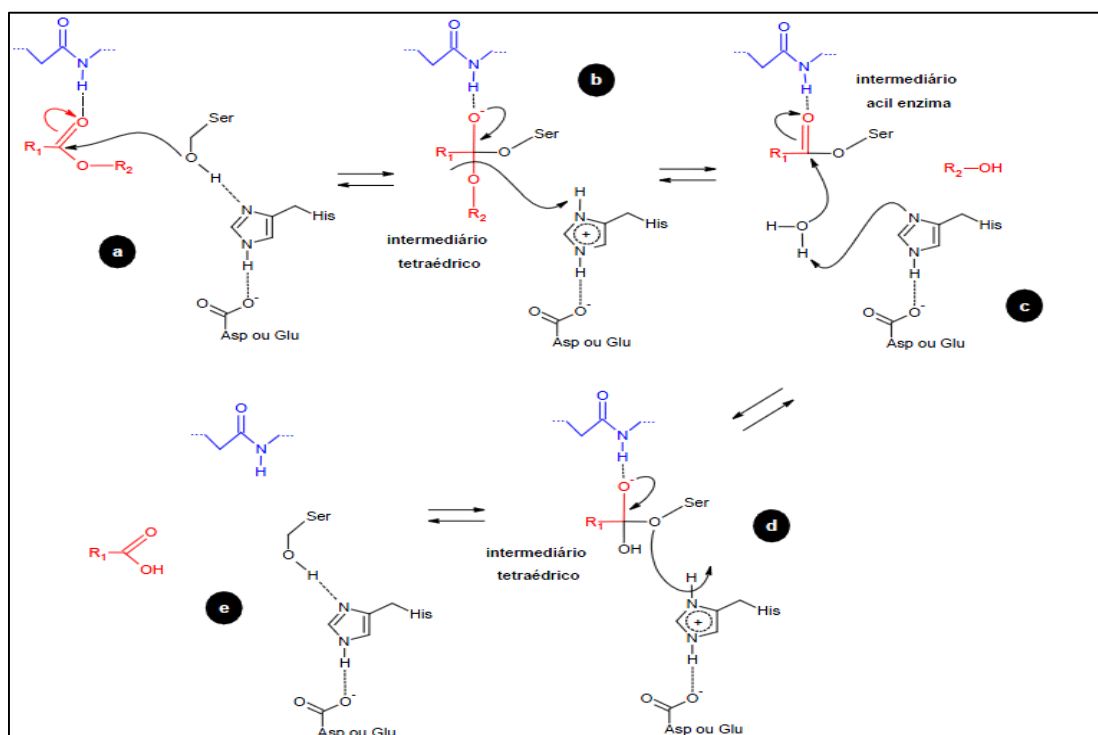


Figura 4. Mecanismo catalítico de hidrólise de ligações de éster catalisada por esterases e lípases (Vaz e Choupina, 2012).

A tríade catalítica e a água são visualizadas a preto, os resíduos do espaço oxianiónico a azul e o substrato a vermelho. Em (a) ocorre ataque nucleofílico do hidroxilo da serina do carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, em (b) forma-se um intermediário tetraédrico que é estabilizado pelos resíduos catalíticos de His e Asp, em (c) uma molécula de álcool é liberta para formar um complexo de acil-enzima e ocorre um segundo ataque nucleofílico por um ião hidroxila da água, em (d) ácido graxo é libertado e (e) a enzima é regenerada (Bornscheuer, 2002; Vaz e Choupina, 2012).

A utilização de hidrocarbonetos pelos microrganismos em condições aeróbicas envolve a participação de oxigénio molecular como reagente, na presença de co-substrato oxidável, esta reacção é catalisada por uma monoxigenase (Hernández-López *et al.*, 2016).

Nos fungos, o processo de assimilação do diesel reside na ocorrência da oxidação do substrato no microsoma, o processo é intercedido pela CPR como parceiro redox, NADPH como doador de electrões e enzimas monoxigenases do citocromo P₄₅₀ (CYP) que desempenha o papel no metabolismo oxidativo de metabolitos endógenos para todos os domínios (Yang *et al.*, 2024).

O sistema CYP nos fungos catalisa a reacção de monoxigenase $RH + O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow ROH + H_2O$, a traves de inserção de dois átomos de oxigénio molecular no substrato, enquanto o secundo átomo de oxigénio é reduzido a uma molécula de água, figura 5 (Duraiaraj *et al.*, 2016).

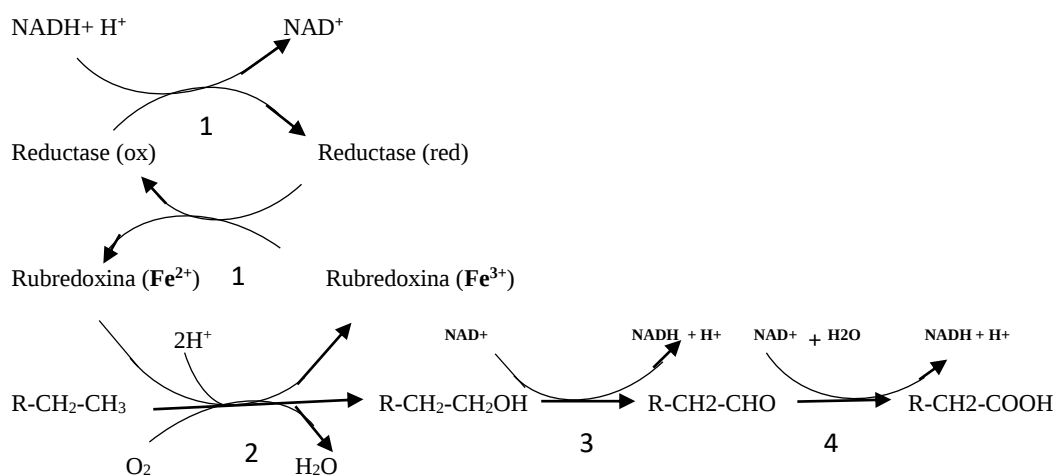


Figura 5. Mecanismo de oxidação de um n-alceno do diesel pelo sistema CYP. 1, Rubredoxina: NADH oxirredutase; 2, n-alceno monoxigenase; 3, álcool desidrogenase; 4, aldeído desidrogenase (Gottschalk e Gottschalk, 1986).

3.5 Biodegradabilidade do diesel e biodiesel

A maioria dos microrganismos são capazes de oxidar hidrocarbonetos com cadeia de C-10 a C-20 de comprimento, o diesel que contém vários hidrocarbonetos com cadeia que varia de C-8 a C-26 de comprimento é propenso a ataque microbiano (Ameen *et al.*, 2016). A biodegradação do diesel é complexa depende das características da mistura de hidrocarbonetos, factores ambientais e o tipo de microrganismo (Tomalá e Wilson, 2021).

A biodegradação do biodiesel está associada a sua capacidade química, que é formado por ésteres gordos que podem ser facilmente oxidados e pela ausência de hidrocarbonetos aromáticos (Correa, 2021).

3.6 A associação de planta e microrganismo frente a contaminação com diesel e biodiesel, efeitos em resposta fisiológica da planta

O processo de germinação ocorre com presença de água para activar metabolismo, crescimento e desenvolvimento de embrião, durante esse processo ocorre com consumo de oxigénio, a mobilização de reservas, fosforilação oxidação, forma-se as espécies reactivas de oxigénio. E esse processo é afectado pela qualidade das sementes e de factores internos e externos como a luz, temperatura e substrato (Reis, 2017).

O efeito fisiológico á presença de contaminantes nas plantas é a redução do crescimento devido ao stress osmótico e oxidativo, (Hernández-Ortega *et al.*, 2014). O dano causado pelo efeito hidrofóbico que limita a disponibilidade de água para as raízes, começa imediatamente depois que a concentração do contaminante aumenta na raiz para níveis acima da tolerância da planta, consequentemente inibe o crescimento, reduz a divisão celular, área foliar e a taxa de assimilação líquida e por último stress induzido pela produção de espécies reactivas de oxigénio, que inclui o radical superóxidos (O_2^-), radical hidroperoxido (HO_2^-), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical hidroxilo ($-OH$), oxigénio singulete ($1O_2$) (Hernández-Ortega *et al.*, 2014; Freire, 2016).

Os hidrocarbonetos se unem a superfície das raízes e criam um ambiente hidrofóbico que limita absorção de água e limita a respiração celular devido a toxicidade dos compostos, o que resulta no baixo desenvolvimento das plantas, os contaminantes orgânicos penetram nas células vegetais e causa alterações significativas nos diferentes processos metabólicos intracelulares (Hernández-Ortega *et al.*, 2014)

Para contornar o dano causado pela presença do contaminante é necessário activação de mecanismos bioquímicos como a síntese e acúmulo de osmolitos protetores e enzimas do sistema antioxidante para a manutenção dos diferentes processos fisiológicos como abertura dos estómatos, a fotossíntese e a expansão celular (Cardona-Ayala *et al.*, 2014). Existem microrganismos que possuem genes que codificam enzimas para a degradação combustíveis e podem adaptar-se ambientes mais extremos (Florez e Céspedes, 2020). Esses microrganismos são capazes de utilizar hidrocarbonetos e compostos orgânicos como fonte de carbono.

3.7 Substrato de fungos

O substrato (bolor de pão) possuem fungos pertencem a subdivisão Zygomycotina, classe Zygomycetes, ordem Mucorales, género *Rhizopus*, sobrevive em solos, os esporos podem sobreviver em períodos largos, períodos de seca prolongada e temperaturas altas (Moraes,

2021). Geralmente não causa infecção directa a tecidos vivos já que necessita de uma ferida superficial para que o esporo possa germinar (Souza *et al.*, 2017). Este grupo inclui o género *Mucor*, que é geralmente sapróbicos, pode crescer em resíduos agro-industriais e produz enzimas hidrolíticas extracelulares com aplicações industriais (Al Mousa *et al.*, 2022).

O género *Aspergillus* e *Penicillium* pertencem ao filo *Ascomycota*, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, família *Trichocomaceae* (Silva *et al.*, 2015), o género *Aspergillus* apresenta um crescimento rápido e nenhuma exigência nutricional específica para sua reprodução (Oliboni, 2022). O género *Penicillium*, possui baixa exigência nutricional, tolera condições físico-químicas variadas, geralmente crescer em qualquer ambiente e podem ser encontrados em todos os substratos (Dantas, 2013).

O género *Fusarium* pertence a divisão *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, Ordem *Hypocreales*, família *Nectraceae*, maior parte das espécies são habitantes comuns do solo, capazes de persistirem na forma de micelios ou clamidosporos e são reconhecidos pela capacidade de produção de metabolitos secundários que influencia a produção de hormonas nas plantas (Barreto, 2018).

3.8 *Vigna unguiculata*

A espécie de *Vigna unguiculata* pertence a família *Fabaceae*, ordem *Fabales*, sub-classe *Magnoliopsida*, classe *Rosidae*, sub-divisão *Magnoliophytina* (*Angiospermae*), divisão *Spermatophyta*, descritor (L.) Walp (Jardim Botânico UTAD, 2024).

A *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (feijão Nhemba) tem importância socioeconómica como suprimento alimentar, por apresentar altos níveis proteicos e de aminoácidos em suas sementes (Medeiros, 2020), socioeconomicamente é importante por apresentar inúmeras potencialidades em relação a farinha de feijão Nhemba sendo utilizado nas diversas formulas alimentares como pães, cookies, hambúrguer e biscoitos (De Oliveira *et al.*, 2021).

A relevância observa-se quando aplicado nos diversos alimentos ao agregar valores nutricionais, com isso mostra que esta espécie de *Vigna unguiculata* (L.) Walp tem um elevado potencial no mercado internacional como matéria-prima para novos estudos e pesquisas de novas fórmulas alimentares (De Oliveira *et al.*, 2021).

4. Metodologia

4.1 Área de estudo

A cidade de Maputo localiza-se geograficamente na região sul de Moçambique, ocupa uma área de cerca de 347,69 Km² com uma população estimada cerca de 1.209.992 habitantes, com uma densidade populacional de 4.033 Habi/Km². Estende-se ao distrito municipal de KaTembe ao bairro de Chiango no sentido Sul/norte e de ilha de Inhaca ao vale de Infulene, na orientação Este/Oeste. Faz o seu limite com a província de Maputo no extremo norte, sul e oeste e é banhado pelo oceano indico no extremo Este, onde se localiza a ilha de Inhaca (INE, censo 2007). Campus principal da UEM Av. Julius Nyerere, no 3453 e Faculdade de Engenharia, Km 1.5

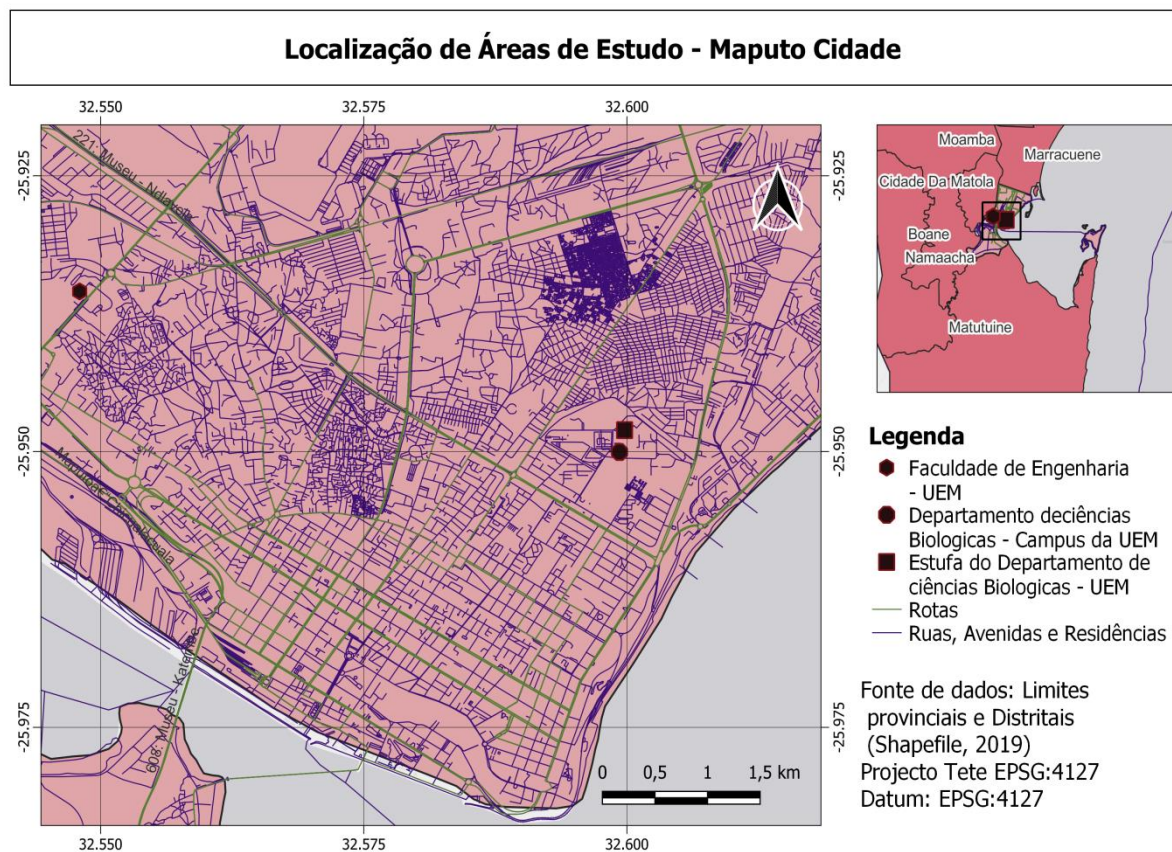


Figura 6. Localização do Campus principal da Universidade Eduardo Mondlane e da Faculdade de Engenharia.

4.2 Materiais

4.2.1 Equipamentos

- Picnómetro
- Viscosímetro
- Rancimat
- Placa de aquecimento
- Motor gerador
- Estufa
- Balança analítica
- Suporte para tubos de ensaios
- Suporte universal
- Saco plástico

4.2.2 EPI

- Bata
- Luvas de látex
- Mascaras de protecção
- Papel absorvente

4.2.3 Vidraria

- Balão de fundo chato 500 ml
- Erlenmeyer 200 ml (3)
- Bequer 100 ml (2)
- Balão volumétrico 50 ml (4)
- Bureta de 50 ml
- Magneto
- Pipetas de Pasteur
- Copos de vidro
- Termómetro
- Funil de decantação
- Proveta
- Tubos de ensaio
- Garrafas de plástico transparente

4.2.4 Reagentes

- Hidróxido de sódio (NaOH)
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄)
- Metanol 99,9%
- Etanol 99,9 %
- Éter Dietílico 99,9%
- Diftalato de potássio
- Fenolftaleína

4.2.5 Matéria-prima

- Gordura animal
- Óleo residual de fritura
- Diesel fóssil
- Óleo vegetal
- Bolor de pão

4.3 Método

O processo de avaliação da biodegradação do diesel e biodiesel por fungos foi dividido em duas etapas: a primeira etapa foi realizada na Faculdade de Engenharia, Departamento de Engenharia Química no laboratório do ambiente e a segunda etapa foi realizada na Faculdade de Ciência Departamento de Ciências biológicas, na estufa

A primeira etapa (etapa química) envolveu formação de soluções de hidróxido de sódio, fenolftaleína e sua padronização; determinação de parâmetros físico-químicas como índice de acidez, ácidos gordos livres, formação de ésteres (esterificação); obtenção do biodiesel e caracterização do diesel e do biodiesel que envolve determinação de parâmetros como, índice de acidez, ácidos gordos livre, densidade, viscosidade, estabilidade oxidativa (Encinar *et al.*, 2011).

4.3.1 Síntese de biodiesel

O processo de síntese das amostras de biodiesel envolveu reacções de esterificação num reaktor de 500 mL, em proporções de 1:1 de óleo e metanol com 1% de ácido sulfúrico sob agitação constante temperatura de 65 °C, e foram colocadas em um funil de separação para extracção dos ésteres (Encinar *et al.*, 2021).

Na reacção de transesterificação, as amostras de óleo e de gordura foram pré-aquecida entre 55 °C - 65 °C, as proporções dos reagentes foram de: o metanol 100 mL, amostra de óleo 500 mL e hidróxido de sódio 2 g e duração da reacção foi de 30 á 60 minutos (Encinar *et al.*, 2021; Encinar *et al.*, 2011). O início da reacção ocorreu com adição do catalisador metóxido de sódio com aumento da temperatura até 90 °C, a fonte de calor foi desligada e agitação foi mantida por 15 minutos e posteriormente foi colocado num funil de decantação para extracção (Encinar *et al.*, 2021; Encinar *et al.*, 2011).

Na determinação dos parâmetros foram usados equipamentos como, picnómetro, viscosímetro, rancimat e foi feito titulação para índice de acidez e para índice de ácidos gordos livres (Dib, 2010).

4.3.2 Análises de propriedades físico-químicas

4.3.2.1 Viscosidade cinemática

A figura 4 mostra o viscosímetro de *redwood*, usado neste ensaio, o qual é constituído por um banho-maria, 2 termómetros dos quais servem para medir a temperatura da água do banho e o outro para medir a temperatura da amostra, um regulador de corrente, um orifício de corrimento de 1,62 à 3,80 mm e um balão de 50 mL (Herrera, 2014).

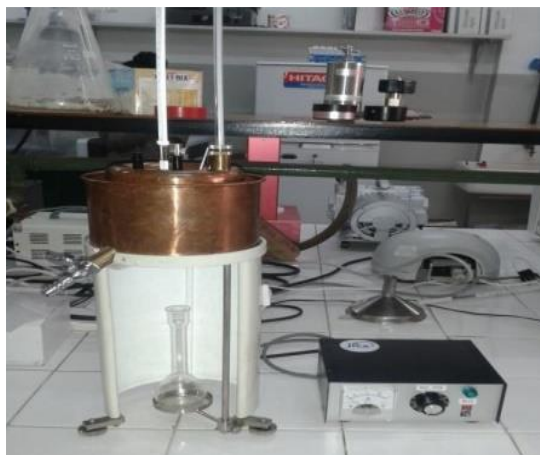


Figura 7. Viscosímetro de redwood com regulador de corrente, (Patreque Júnior, 2016)

Ligou-se o equipamento e regulou-se a potência em (Kw) para aquecer água até a temperatura de 40 °C, durante o ensaio, água do banho-maria foi mantida a uma temperatura de 40 °C. Quando amostra atingiu os 40 °C abriu-se o orifício do viscosímetro e o balão em baixo do viscosímetro enche-se até um volume de 50 ml e registou-se o tempo.

O procedimento foi repetido cinco vezes e quanto maior fosse o tempo necessário para o escoamento, mais viscoso ficou o produto, de acordo com a norma ASTM D445 (Aguiar, 2013). E os dados foram obtidos pelas duas equações, dependendo do intervalo de tempo registado segundo a norma EN 14214.

$$t \in [30,100]: \quad v = 0.260 \times t - \frac{179}{t}$$

$$t \in [100,2000]: \quad v = 0.247 \times t - \frac{50}{t}$$

Onde: v -Velocidade cinemática a 40 °C e t -Tempo

4.3.2.2 Índice de acidez

O método EN14214 possibilitou analisar 5 g de amostra de óleo, do diesel e biodiesel com adição de 25 mL de éter dietílico e etanol na proporção de 1:1, seguido do processo de titulação com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M previamente padronizado e utilizou-se uma solução alcoólica de fenolftaleína 1% como indicar. Através do gasto do volume do hidróxido de sódio na neutralização da amostra de óleo, do diesel e biodiesel, o IA foi determinado pela equação 3:

$$IA = \frac{M \cdot f \cdot v \cdot 40}{p}$$

Onde:

IM – Índice de acidez (mg de NaOH/g)

v – Volume (ml) de NaOH gasto na titulação

M – Molaridade da solução de NaOH

p – Peso da amostra em gramas

f – Factor de correcção

40 – Massa molecular do NaOH

4.3.2.3 Densidade e ácidos gordos livres

A determinação da densidade das amostras foi feita com auxílio de um picnómetro de 26,456 ml do volume e foi previamente pesado. Mediu-se a temperatura de cada amostra e do picnómetro cheio (Josefina, 2016), a determinação da densidade foi realizada através da equação 4:

$$p = \frac{mf - mi}{v}$$

Onde:

mi – Massa do picnómetro vazio

mf – Massa do picnómetro cheio

v – Volume do picnómetro

Para determinação de ácidos gordos livres usou-se o procedimento 4.3.2.2 usado para determinação de índice de acidez, a determinação é segundo a equação 5:

$$\%AGL = \frac{CNaOH \times 28.2}{Vg}$$

Onde:

$CNaOH$ concentração real de NaOH [M]

Vg o volume gasto na titulação [ml]

4.3.3 Estabilidade oxidativa

O teste de estabilidade oxidativa foi realizado seguindo a metodologia descrita na EN 14112, utilizou-se o equipamento Rancimat modelo 743 da Metronhm. Com uma corrente de ar

purificado (10 L/h) que passou por uma amostra de 3 g em um tubo de ensaio de vidro dentro do aquecedor de bloco controlado por termóstato (110 °C).

Produtos de oxidação voláteis principalmente ácidos carboxílicos de cadeia curta foram retirados do tubo de ensaio e colectados em um copo de medição contendo 60 ml de água destilada, onde a condutividade foi medida continuamente (Zhou *et al.*, 2016; Valle *et al.*, 2014).



Figura 8. Aparelho de Rancimat modelo 743 Metronhm (Josefina, 2016).

4.3.4 Avaliação da fitotoxicidade

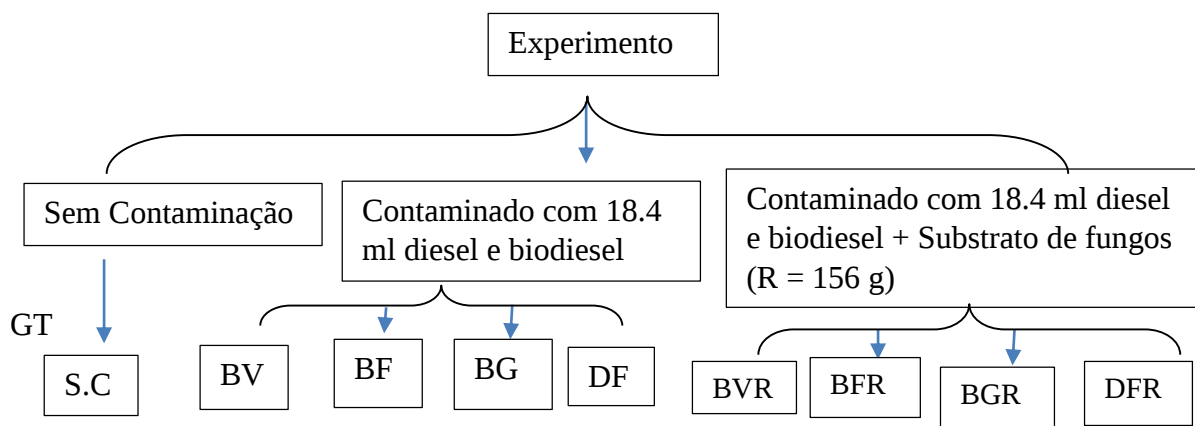
A segunda etapa (etapa biológica) envolveu o cultivo do substrato de fungos (bolor de pão), implementação do experimento de biorremediação e determinação de factor de crescimento como a taxa de germinação, taxa de crescimento da cultura, taxa de assimilação líquida e índice de área foliar. Nas condições de cultivo do bolor de pão, utilizou-se quatro fatias de pão branco de forma e foram armazenado em plásticos a uma temperatura de 32 °C durante dez dias. O substrato de fungos foi ralado e conservado por 7 dias para utilização posterior.

4.3.4.1 Delineamento experimental

Inicialmente foram pesadas 1400 g de solo e foram colocados em 9 vasos plásticos (de 30 cm de altura e 17 cm de diâmetro interno), em seguida 8 vasos foram contaminados com 18.4 ml do diesel e biodiesel numa concentração de 100%, posteriormente. Dos 8 vasos, 4 foram adicionados 156 g de substrato do fungo a cada vaso e foram completamente misturados (Mohammadi-Sichani *et al.*, 2019).

Os experimentos foram conduzidos em triplicatas com duas repetições. Os vasos foram colocados entre 25 e 35 °C em uma estufa, para a manutenção do oxigênio e da humidade no solo, foi regado a cada três dias e o solo foi pré-misturado para que houve-se alocação de

oxigénio para os microrganismos (Mohammadi-Sichani *et al.*, 2019) e foram feitas colheitas após 30 à 60 dias.



Onde: onde GT são grupos de tratamento, S.C- sem contaminação, BV- biodiesel vegetal, BF- biodiesel de fritura, BG- biodiesel de gordura, DF- diésel fóssil, BVR- biodiesel vegetal + *Substrato de fungos*, BFR- biodiesel de fritura + *Substrato de fungos*, BGR- biodiesel de gordura + *Substrato de fungos*, DFR- diésel fóssil + *Substrato de fungos*.

4.3.4.2 Ensaio de fitotoxicidade

A toxidade dos solos contaminados com e sem o fungo *Rhizopus ssp*, *Mucor ssp*, *Aspergillus ssp*, *Penicillium* e *Fusarium* foi avaliada pelo teste de germinação de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., foram colocadas 4 sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp para cada tratamento. A contagem das sementes germinadas foi realizada de 7 à 14 dias, contados apartir do dia após a instalação da experiência, foram consideradas sementes germinadas as que apresentava emissão completa da radícula e a taxa de germinação foi obtida pela razão do número de sementes germinadas, pelo número de sementes alocadas inicialmente no vaso germinador (De Franca Ferreira *et al.*, 2023).

4.3.4.3 Análise de crescimento vegetal

Foram feitas colheitas a cada 4 semanas por unidade experimental. No campo foram tomadas medidas no solo entre os vasos e em laboratório foi feita a dissecação de cada parte dos órgãos da planta para determinação da área foliar e quantificação da matéria seca das folhas e planta toda. Foram colocadas em uma estufa a 70 °C por 48 horas e posteriormente foram realizados cálculos de índice de área foliar (IAF), taxa de assimilação líquida (TAL) e taxa de crescimento da cultura (TCC) através de fórmulas de valores instantâneos (Santos-Castellanos *et al.*, 2010).

$$IAF = \frac{AF}{As} \quad (\text{Equação 6}) \quad TAL = \frac{1}{AF} * \frac{dW}{dT} \quad (\text{Equação 7})$$

$$TCC = \frac{1}{As} * \frac{dW}{dT} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

AF- área foliar,

As- área do solo entre os vasos,

dW- peso seco total,

dT- tempo.

4.3.4.3 Análise estatística

Os dados colectados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com *software* Sigmaplot 15.0, tendo sido efectuados os testes de.

- Shapiro-Wilk para detectar a distribuição normal dos dados
- Kruskal-Wallis para análise unidirecional de variância para dados que não possuem distribuição normal
- Brown-Forsythe, para análise unidirecional de variância para dados que possuem distribuição normal
- Os testes Tukey para comparação múltipla entre os grupos de tratamentos
- Teste de correlação de Pearson para dados parâmetros de acordo com o sistema de análise estatística em $p < 0.05$. Para a construção dos gráficos da taxa de germinação foi usado SPSS.

5. Resultados e discussão

5.1 Resultados

Foram apresentados em detalhe os resultados experimentais obtidos na determinação dos parâmetros físico-químicos e do efeito do substrato de fungos sobre as amostras do diesel e biodiesel ao longo do experimento.

5.1.1 Caracterização da matéria-prima

Foram feitos ensaios de índice de acidez, viscosidade, densidade e ácidos gordos livres para caracterização de óleo vegetal, de fritura, de gordura animal e os resultados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do óleo vegetal, fritura e de gordura animal.

Propriedades físico-químicas	Óleo vegetal	Óleo vegetal de fritura	Gordura animal
Viscosidade (mm ² /s)	12.9255	47.1635	52.9607
Densidade (g/mL)	0.9101	0.9069	0.8917
Ácidos gordos livres (% oleico)	77.2680	36.6600	18.8631
Índice de acidez (mg/g)	10.4657	17.1296	32.9611

5.1.2 Obtenção do biodiesel e caracterização das amostras de biodiesel

Foram feitos ensaios de índice de acidez, viscosidade e densidade para caracterização do biodiesel e diesel, os resultados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas das amostras do diesel e biodiesel.

Propriedades físico-químicas	Biodiesel vegetal (BV)	Biodiesel de fritura (BF)	Biodiesel Gordura (BG)	Diesel comercial (DF)
Viscosidade (mm ² /s)	9.7501	7.7765	9.1036	4.5929
Densidade (g/mL)	0,8745	0,8675	0,8656	0,8019
Índice de acidez (mg/g)	1.9393	1.9521	1.9482	1.9479

5.1.3 Estabilidade oxidativa das amostras por Rancimat

Os resultados obtidos pelo método Rancimat para as amostras do diesel e do biodiesel foram amplamente variados, entre 0.0-0.96/h BV, 0.0-3.53/h BG, 0.0-5.30/h BF e 0.0-25.08/h DF respectivamente. A estabilidade do biodiesel é menor em relação a do diesel fóssil, com uma ordem de eficiência no método Rancimat conduzido a 110 °C é BV <BG <BF <DF e o tempo necessário para o início da oxidação foi caracterizado por um rápido aumento na condutividade nas amostras, com seguinte ordem BV> DF> BG> BF, (Figura 7).

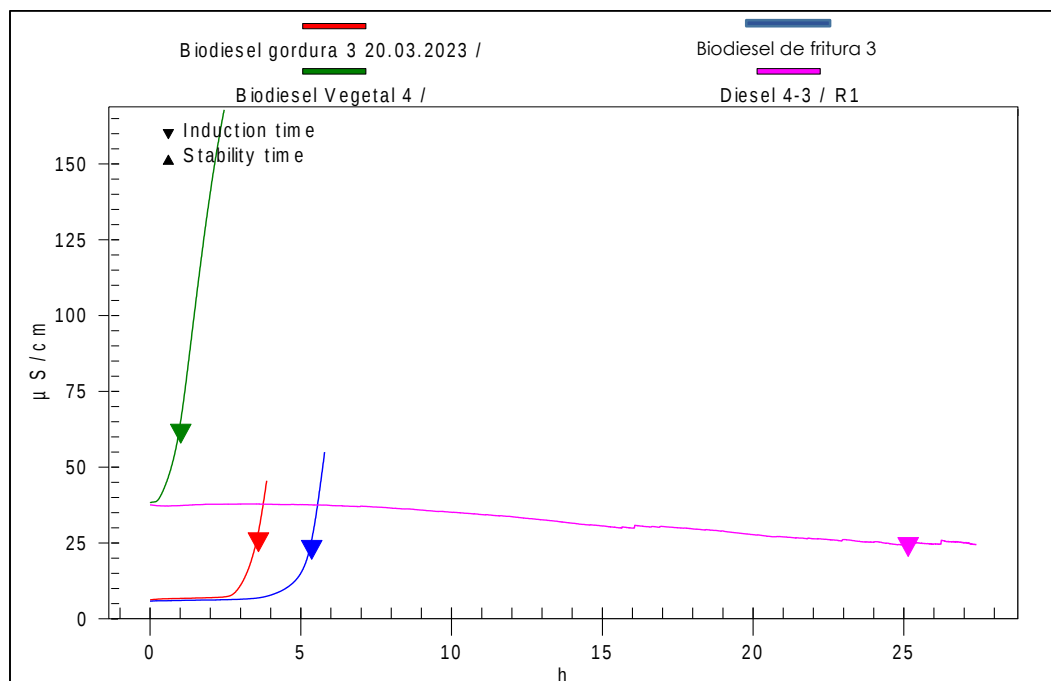


Figura 9. Período de indução das diferentes amostras de combustíveis (BV, BG, BF e DF) obtidos pelo método Rancimat.

A mostra DF apresenta resultado satisfatório, alcançando um período de indução de 25.08 h, muito acima do limite de especificação de 8 h de acordo com o método EN14112, seguido por BF que exibe uma protecção muito melhor, por conseguir atingir acima da metade do período de indução. Os tratamentos BV e BG em toda faixa investigada não conseguiram atingir nem a metade do período de indução apresentado.

As diferenças observadas no comportamento dos gráficos abaixo esta relacionada com as alterações das diversas propriedades físico-químicas como índice de peróxido, densidade, índice de acidez, viscosidade, poder calorífico e ponto de fulgor das amostras do diesel e biodiesel, (Figura 8).

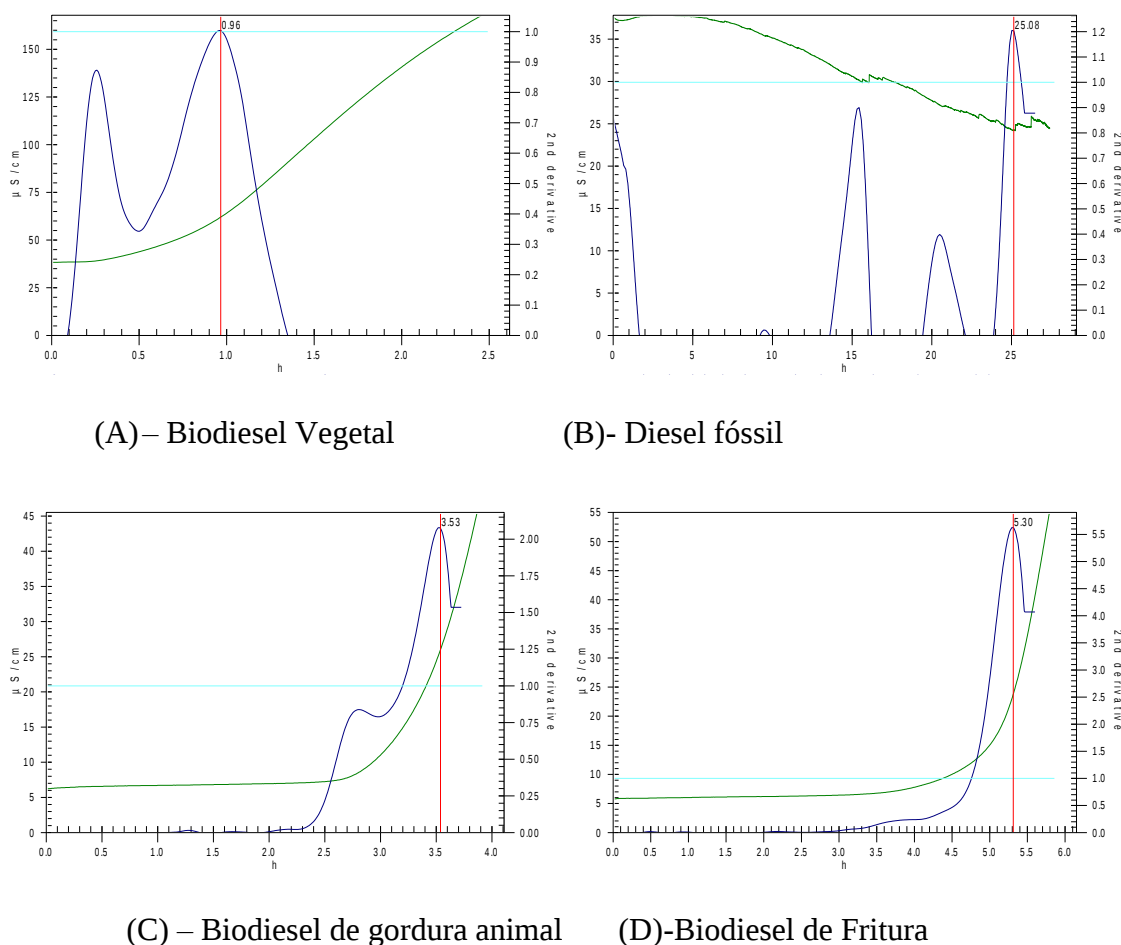


Figura 10. Comportamento das amostras de combustíveis durante o período de indução até o ponto máximo de indução (A, B, C e D).

5.1.4 Taxa de germinação das sementes

O comportamento germinativo das sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, mostra uma influência negativa sobre as sementes pela acção do diesel e biodiesel, observou-se inibição total nos tratamentos com e sem os fungos *Rhizopus ssp*, *Mucor ssp*, *Aspergillus ssp*, *Penicillium ssp* e *Fusarium ssp* (Figura 11).

Os primeiros 7 dias, os tratamentos com concentrações de combustíveis e de fungo não manifestaram germinação, com excepção do controle que apresentou uma taxa de germinação com valor médio 75% das sementes e foram observadas diferencia estatisticamente na ANOVA de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Para isolar grupos que diferem entre si, foi feito um procedimento de comparação múltiplas de pares (teste de Tukey), os resultados obtidos, foram de nenhuma diferença significativa embora o controle tenha diferido dos demais tratamentos ($p > 0.05$) (Figura 11).

Aos 14 dias foram observadas medianas diferentes, no controle, cerca de 100% das sementes de *V. unguiculata* (L.) Walp, germinaram e para os demais tratamentos as taxas foram inferiores ou igual 50%, estes dados mostram diferenças estatisticamente significativas na ANOVA de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Entretanto, para isolar grupos que diferem dos outros, foi feito um procedimento de comparação múltiplas de pares não houve diferença significativa entre as duas somas de classificação que inclui essas comparações, embora o controle tenha apresentado uma mediana muito alta em relação os demais tratamentos teste Tukey ($p > 0.05$) (Figura 12).

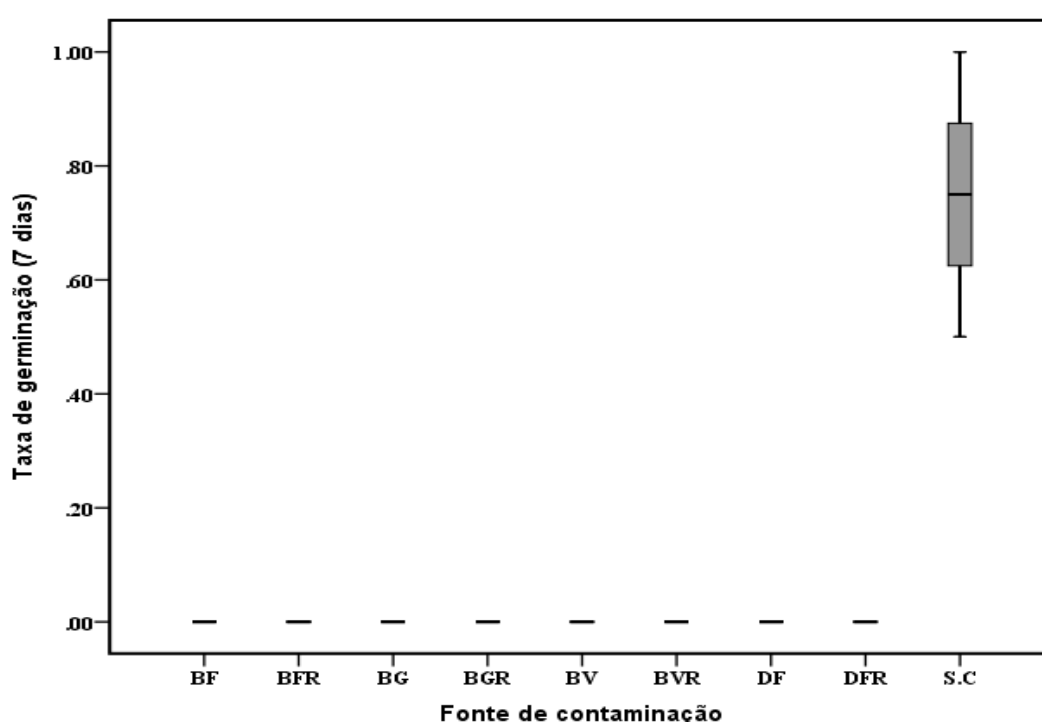


Figura 11. Taxa de germinação de sementes *Vigna unguiculata* (L.) Walp por tratamento ao longo de 7 dias.

Legenda: S.C- Sem contaminação, BVR- Biodiesel vegetal + substrato de fungos, BGR- Biodiesel de gordura + substrato de fungos, BFR- Biodiesel de fritura + substrato de fungos, DFR- Diesel fóssil + substrato de fungos, BV- Biodiesel vegetal, BG- Biodiesel de gordura, BF- Biodiesel de fritura e DF- Diesel fóssil.

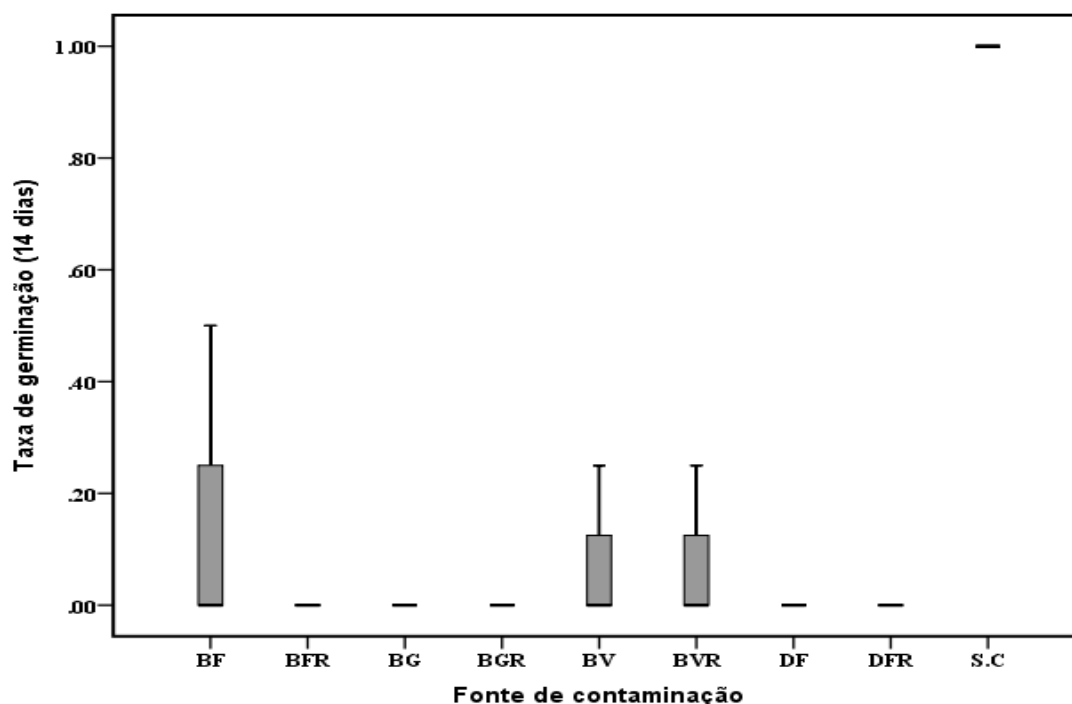


Figura 12. Taxa de germinação de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp por tratamento ao longo de 14 dias.

Legenda: S.C- Sem contaminação, BVR- Biodiesel vegetal + substrato de fungos, BGR- Biodiesel de gordura + substrato de fungos, BFR- Biodiesel de fritura + substrato de fungos, DFR- Diesel fóssil + substrato de fungos, BV- Biodiesel vegetal, BG- Biodiesel de gordura, BF- Biodiesel de fritura e DF- Diesel fóssil.

O diesel e biodiesel apresentaram resultados negativo para as sementes de *Vigna unguiculata*(L.) Walp, os contaminantes mostraram-se desfavoráveis ao processo de germinação das sementes e os fungos são inefficientes ao processo descontaminação durante o período de germinação de 14 dias.

5.1.5 Análise de crescimento

Nas análises após 30 dias do início do experimento, o tratamento com maior taxa de assimilação líquida da planta *Vigna unguiculata* (L.) Walp, foi o diesel fóssil + fungo *Rhizopus ssp*, *Mucor ssp*, *Aspergillus ssp*, *Penicillium ssp* e *Fusarium ssp* (DFR) com uma mediana de $2.733 \text{ g.m}^{-2}.\text{semana}^{-1}$, com valor mínimo da taxa de assimilação líquida para meio neutro (S.C) de $0.947 \text{ g.m}^{-2}.\text{semana}^{-1}$, esses valores não foram estatisticamente significativos entre os grupos de tratamento na ANOVA de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$) (Tabela 3).

Legenda (Tabela 3): S.C- Sem contaminação, BVR- Biodiesel vegetal + Substrato de fungos, BGR- Biodiesel de gordura + substrato de fungos, BFR- Biodiesel de fritura + substrato de fungos, DFR- Diesel fóssil + substrato de fungos, BV- Biodiesel vegetal, BG- Biodiesel de gordura, BF- Biodiesel de fritura e DF- Diesel fóssil.

Tabela 3. Taxa de assimilação líquida em $\text{g.m}^{-2}.\text{semana}^{-1}$ dos diferentes grupos de tratamento durante 30 dias.

Grupo	N	Mediana	25%	75%
S.C	3	0.947	0.868	1.754
BVR	3	1.420	1.393	1.564
BGR	3	1.310	0.950	1.706
BFR	3	1.327	1.313	1.537
DFR	3	2.733	1.912	2.970
BV	3	1.497	1.180	2.080
BG	3	1.636	1.532	1.913
BF	3	1.247	1.169	9.715
DF	3	2.020	1.703	2.779

O índice de área foliar apresentou valor máximo de 0.367 para tratamento de biodiesel de gordura + Substrato de fungos (BGR) e valores mínimos de 0.093 e 0.108 para diesel fóssil + substrato de fungos (DFR) e de diesel fóssil (DF) respectivamente. O valor de BGR apresentou diferenças estatísticas significativas em relação aos tratamentos de DFR e DF na ANOVA unidirecional de Brown-Forsythe ($\alpha = 0.050$: 0.850, $F = 4.120$ e $p < 0.05$) para isolar grupos que diferem entre si, foi feito teste de comparação múltiplas de pares de Tukey ($p < 0.05$) para DFR e DF respectivamente, para os demais grupos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Figura 13).

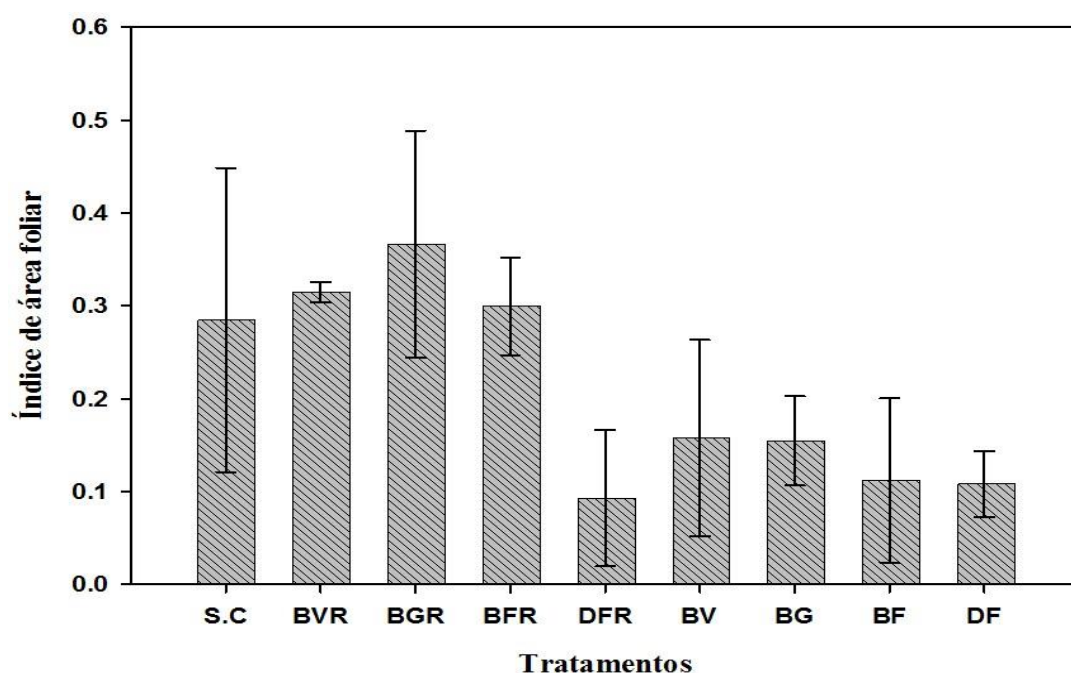


Figura 13. Índice de área foliar dos diferentes grupos de tratamentos durante 30 dias.

Legenda: S.C -Sem contaminação, BVR- Biodiesel vegetal + substrato de fungos, BGR- Biodiesel de gordura +substrato de fungos, BFR- Biodiesel de fritura + substrato de fungos, DFR- Diesel fóssil + substrato de fungos, BV- Biodiesel vegetal, BG- Biodiesel de gordura, BF- Biodiesel de fritura e DF- Diesel fóssil.

A taxa de crescimento da cultura (TCC) apresentou flutuações entre os tratamentos BFR, BVR e BGR com valores máximos de $0.419 \text{ g.m}^{-2}.\text{semana}^{-1}$ para BFR, 0.460 para BVR e $0.471 \text{ g.m}^{-2}.\text{semana}^{-1}$ BGR respectivamente. O tratamento S.C apresenta um valor intermédio em relação aos dados com maior e menor incremento da biomassa, esses pontos de incremento onde foram registados valores altos de TCC, coincide com valores de IAF observados nos tratamentos correspondentes, em termos dos valores máximos observados, na ANOVA unidirecional de Brown-Forsythe ($\alpha = 0.050:0.652$, $F = 3.080$, $p < 0.05$), apesar dos valores não apresentarem diferenças estatísticas significativas entre os grupos na ANOVA de Tukey ($p > 0.05$) (Figura 14).

As flutuações observadas na figura 14 mostram a influência dos fungos *Rhizopus ssp*, *Mucor ssp*, *Aspergillus ssp*, *Penicillium ssp* e *Fusarium ssp*, através da elevada taxa de crescimento da cultura acima do tratamento S.C, apesar de não apresentarem valores estatisticamente significativos.

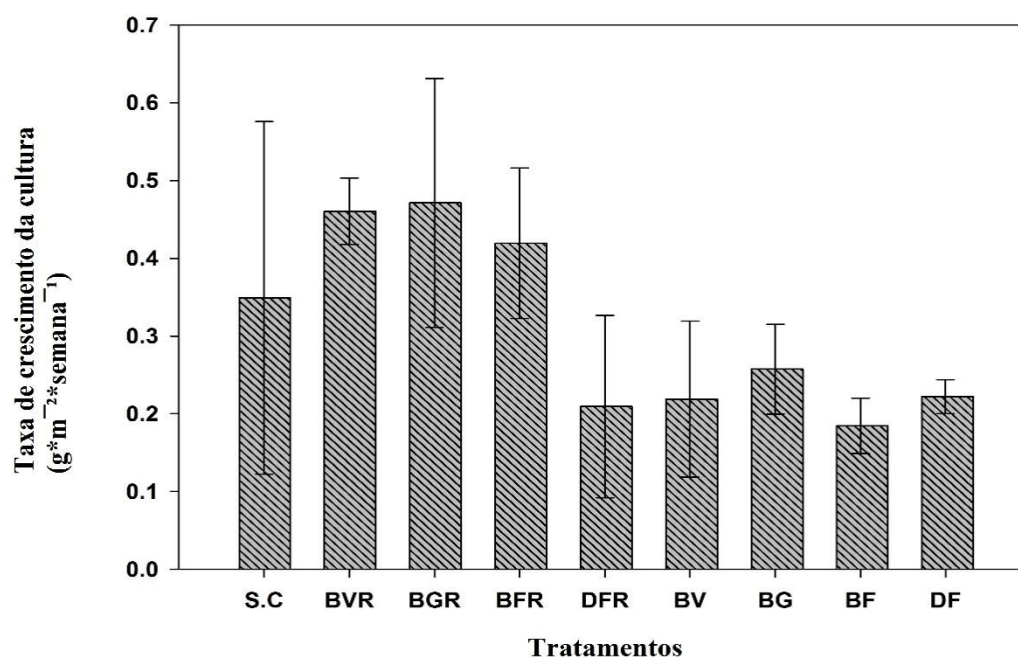


Figura 14. Taxa de crescimento da cultura nos diferentes tratamentos durante 30 dias.

Legenda: S.C-Sem contaminação, BVR-Biodiesel vegetal + substrato de fungos, BGR-Biodiesel de gordura + substrato de fungos, BFR-Biodiesel de fritura + substrato de fungos, DFR-Diesel fóssil + substrato de fungos, BV-Biodiesel vegetal, BG-Biodiesel de gordura, BF-Biodiesel de fritura e DF-Diesel fóssil.

Aos 60 dias, os valores de TAL observados indicaram valor máximo de 2.179 g.m⁻².semana⁻¹ para o tratamento BV e valor mínimo de 0.981 e 1.129 g.m⁻².semana⁻¹ para o tratamento DF e DFR, na ANOVA unidirecional de Brown-Forsythe estes valores obtiveram diferenças estatisticamente significativas ($\alpha = 0.050$: 0.503, $F = 2.550$, $p < 0.05$). Na análise multivariada de Tukey observou-se uma diferença significativa para o tratamento DF ($p < 0.05$) (Figura 15).

Na afigura 15 observa-se uma tendência homogênea no incremento dos valores da TAL dos tratamentos com substrato de fungos em relação os tratamentos sem o substrato, com exceção BV em relação BVR que apresentou um maior aumento de 1.351 g.m⁻².semana⁻¹. Estes resultados mostram uma alta tendência a estabilização nos tratamentos e uma redução na actividade catalítica, características de esgotamento de nutrientes nos vasos.

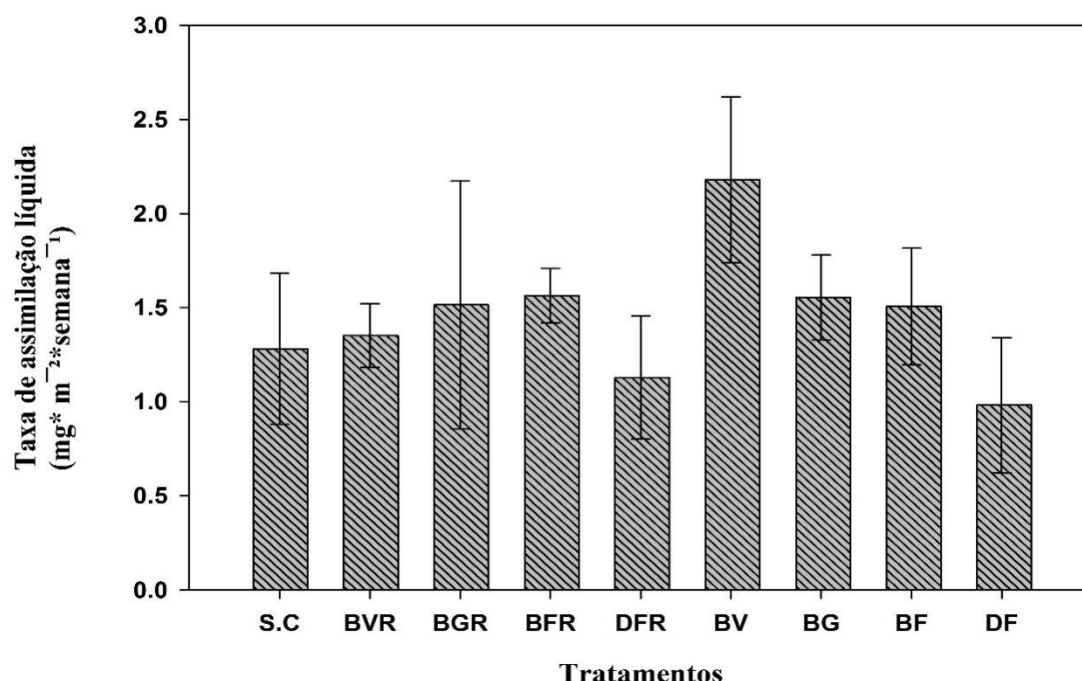


Figura 15. Taxa de assimilação líquida nos diferentes tratamentos, durante 60 dias.

Legenda: S.C-Sem contaminação, BVR-Biodiesel vegetal + substrato de fungos, BGR-Biodiesel de gordura + substrato de fungos, BFR-Biodiesel de fritura + substrato de fungos, DFR-Diesel fóssil + substrato de fungos, BV-Biodiesel vegetal, BG-Biodiesel de gordura, BF-Biodiesel de fritura e DF-Diesel fóssil.

Aos 60 dias, o IAF para tratamento BGR de forma persistente em relação os dados observados no período de 30 dias mostram valores máximos de 0.656 seguido de 0.611 para BVR e valor mínimo de 0.263 para o tratamento BV. Os valores obtidos no período de 60 dias não apresentaram diferenças estatísticas significativas na ANOVA de Brown-Forsythe ($\alpha = 0.050$: 0.245, $F = 1.751$, $p > 0.05$), (Figura 16).

Na afigura 16 observa-se um incremento de IAF para os tratamentos sem inoculo em relação aos primeiros 30 dias, o que mostra um grande aumento na adaptabilidade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. ao diesel e biodiesel, efeito da redução da concentração do contaminante no solo.

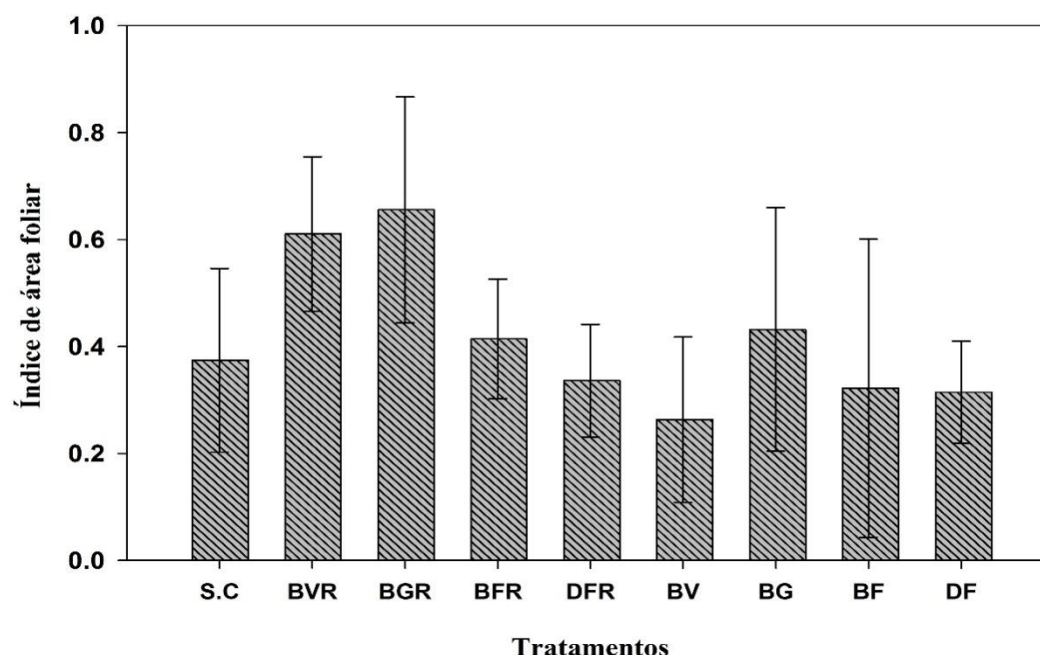


Figura 16. Índice de área foliar nos diferentes grupos de tratamento durante 60 dias.

Legenda: S.C -Sem contaminação, BVR-Biodiesel vegetal + substrato de fungos, BGR-Biodiesel de gordura + substrato de fungos, BFR-Biodiesel de fritura + substrato de fungos, DFR-Diesel fóssil + substrato de fungos, BV-Biodiesel vegetal, BG-Biodiesel de gordura, BF-Biodiesel de fritura e DF-Diesel fóssil.

Os incrementos observados na taxa de crescimento da cultura durante o período de 60 dias, é relevante se for levado em consideração o tratamento controle (S.C). Os valores de TCC para os tratamentos BVR, BGR, BFR, BV, BG e BF se encontra acima de $0.437 \text{ g.m}^{-2}.\text{semana}^{-1}$ do valor do controle com exceção de DFR e DF o que indica a ineficiência dos fungos no processo de descontaminação do diesel fóssil, observa-se diferenças significativas para ANOVA unidirecional de Brown-Forsythe ($\alpha= 0.050$: 0.503, $F = 2.550$, $p < 0.05$), entre tanto, não foram encontrados diferenças estatisticamente significativas nos valores médios para os tratamentos DFR e DF no teste de Tukey ($p > 0.05$) (Figura 17).

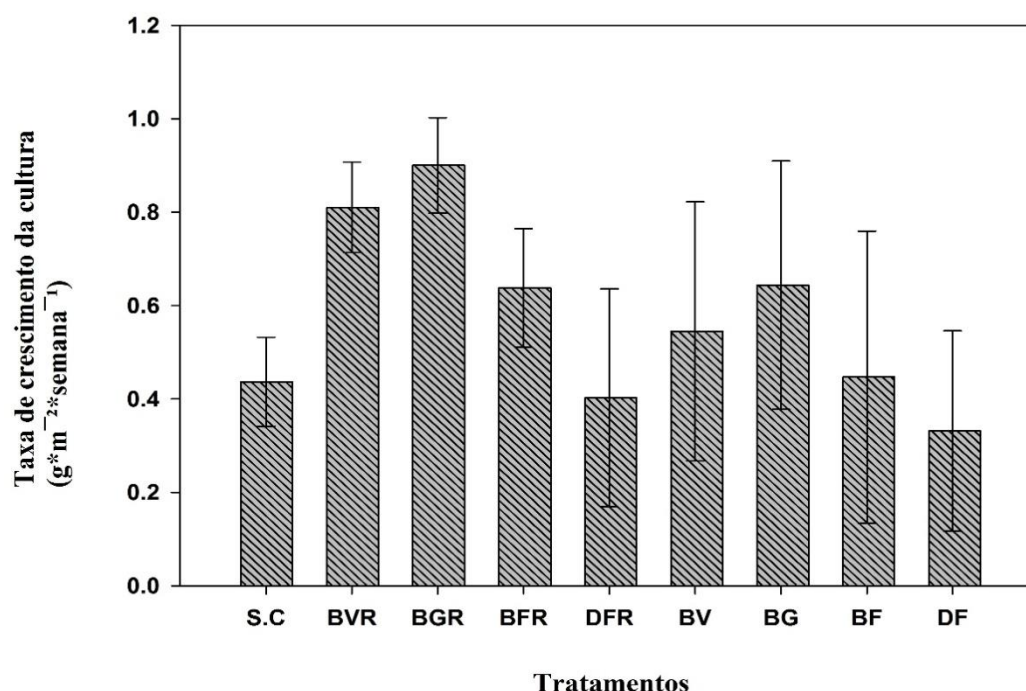


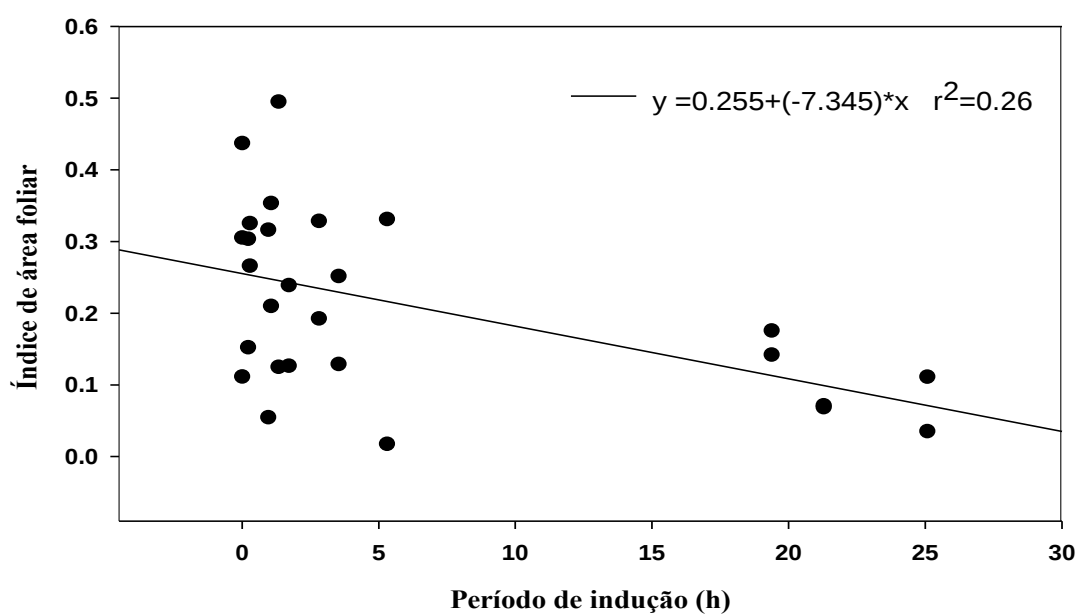
Figura 17. Taxa de crescimento da cultura nos diferentes tratamentos durante 60 dias.

Legenda: S.C-Sem contaminação, BVR-Biodiesel vegetal +substrato de fungos, BGR-Biodiesel de gordura + substrato de fungos, BFR-Biodiesel de fritura + substrato de fungos, DFR-Diesel fóssil + substrato de fungos, BV-Biodiesel vegetal, BG-Biodiesel de gordura, BF-Biodiesel de fritura e DF-Diesel fóssil.

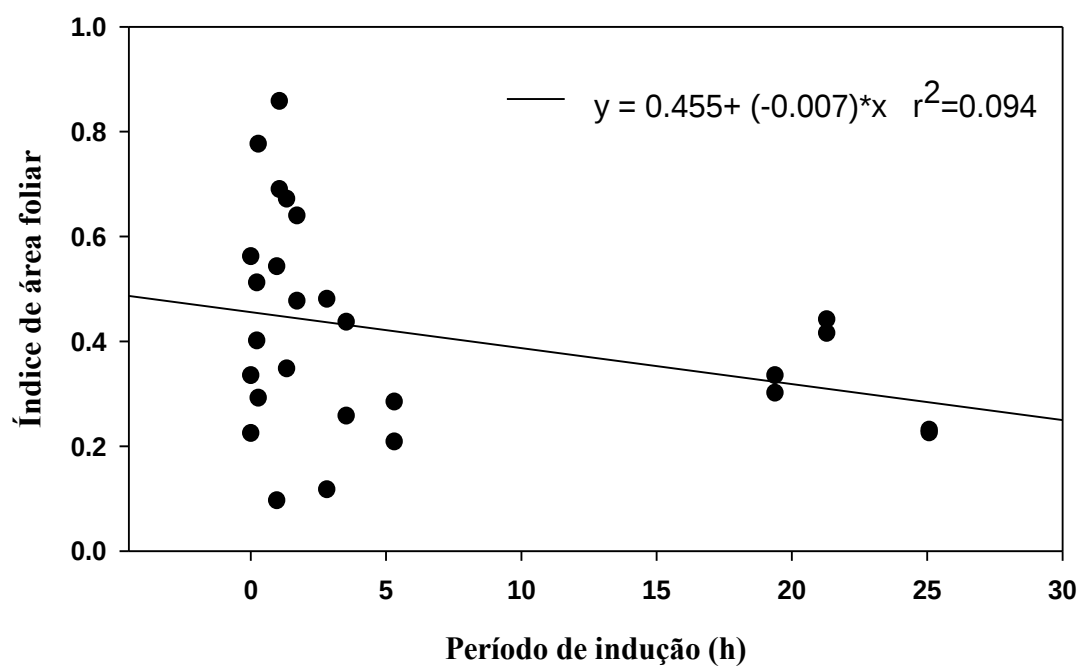
5.1.6 Correlação entre IAF e período de indução

Os dados observados, mostram que os IAF obtidos no período de 30 dias estão diretamente relacionados com o período de indução das amostras do diesel e biodiesel, caracterizado por uma relação inversamente proporcional com um coeficiente de correlação -0.513, com uma observação estatisticamente significativa onde ($p < 0.05$) de acordo com a figura 18 (A).

Este resultado mostra implicações do diesel e do biodiesel na eficiência dos fungos *Rhizopus ssp.*, *Mucor ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Penicillium ssp.* e *Fusarium ssp.*, devido às diferenças na origem das matérias-primas, propriedades físico-químicas das amostras, composição química, a presença de compostos e elementos que agem como antioxidante e a dificuldade dos fungos sintetizarem enzimas específicas ao diesel fóssil e as amostras de biodiesel. No período de 60 dias não foram observadas diferenças de correlação significativas entre IAF e PI, coeficiente de correlação -0.307 e $p > 0.05$, figura 18 (B).



(A)



(B)

Figura 18. Correlação entre índice de área foliar e período de indução das amostras diesel e biodiesel, (A) período de 30 dias e (B) período de 60 dias.

A partir de observações no período de 60 dias, os tratamentos DF e DFR apresentaram uma camada viscosa e oleaginosa envolta das ramificações da raiz, que se encontra ausente nos demais grupos de tratamentos. Os tratamentos DF, BVR, BGR, BFR e S.C mostram um melhor desenvolvimento da estrutura radicular, independente da concentração diesel no tratamento DF seguido pelos tratamentos BF, DFR, BV e BG.

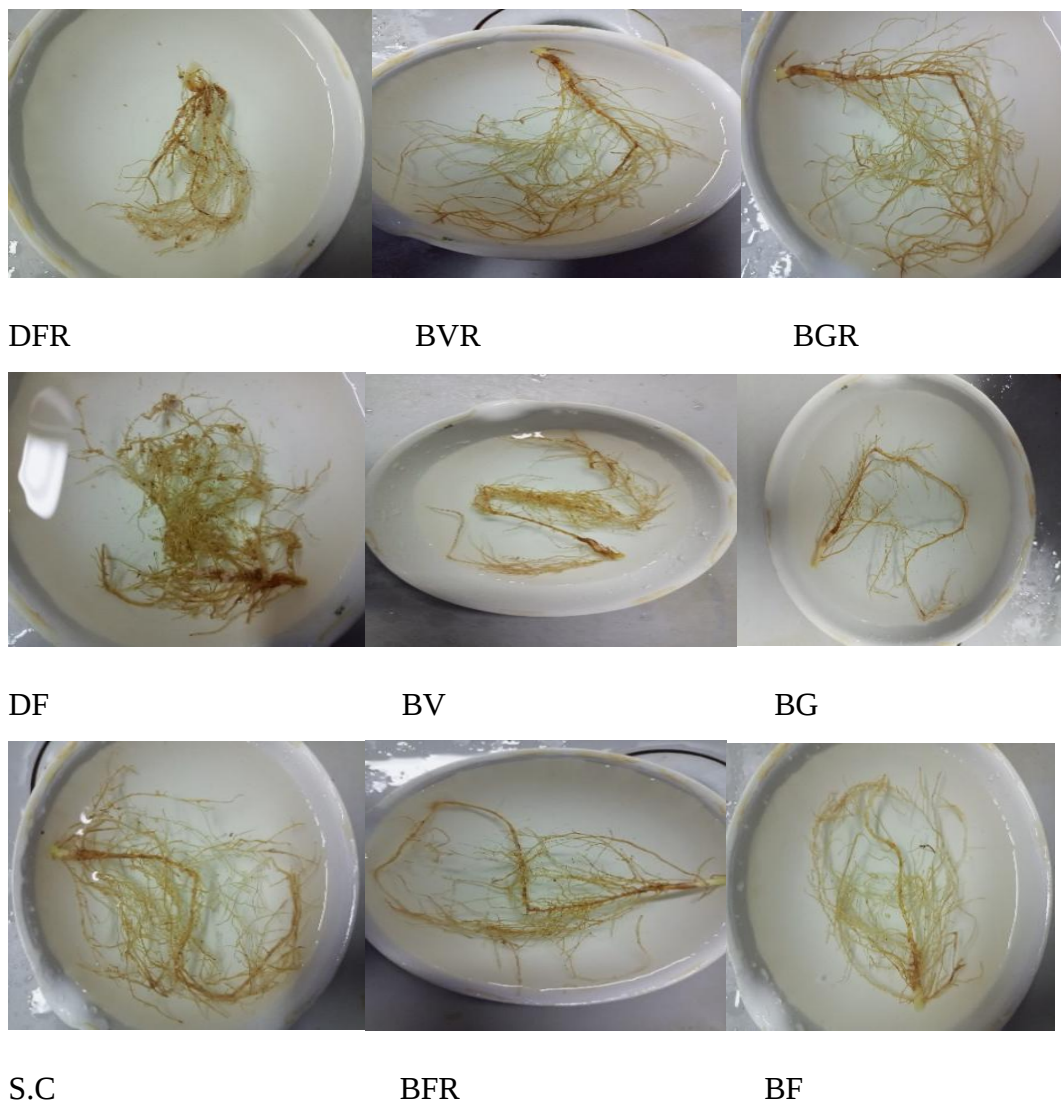


Figura 19. Observação morfológica da raiz nos diferentes tratamentos no período de 60 dias.

Na última semana de experiência foi observado um crescimento sensível nas plantas de *Vigna unguiculata* (L) Walp, especificamente baixo crescimento e facilidade de ser infectado pelo fungo *Erysiphe diffusa*. Observou-se um crescente aumento de infecção nos vasos sem o substrato de fungos em relação os vasos com substrato, de acordo com a figura 20.



(A)

(B)

Figura 20. Infecção de *Vigna unguiculata* pelo fungo *Erysiphe diffusa* nos diferentes tratamentos, (A) tratado com fungo e (B) tratado sem fungo.

5.2. Discussão de Resultados

A estabilidade das amostras de combustíveis mostram facilidade de oxidação do diesel em relação as mostras de biodiesel, dentre as amostras de biodiesel, a BF apresentou maior oxidação e a BV menor oxidação. As diferenças de degradação observadas entre as amostras de biodiesel estão relacionados, com origem das matérias-primas, propriedades químicas das amostras, quantidades de insaturações, concentração de ácidos gordos e a sua composição química.

Os resultados acima vão de acordo com as observações de Kumar (2017) e Longanesi *et al.* (2022), quando avaliavam a estabilidade oxidativa do biodiesel verificou se que o processo de oxidação sofre diversas implicações devido as propriedades do biodiesel influenciado pela temperatura.

Para Hazrat *et al.* (2021) os combustíveis que podem resistir auto-oxidação ou oxidação induzida são aqueles que contem maior teor de ácidos gordos saturados, por serem mais estáveis do que aqueles que contem ésteres alquílicos com ácidos gordos insaturados, e a estabilidade do biodiesel é afectado por vários factores como ausência de antioxidantes e o seu estágio de oxidação (Karavalakis *et al.*, 2010).

As diferenças entre o diesel fóssil e as amostras de biodiesel, para além dos factores descritos acima inclui a ausência de insaturações, a presença de compostos e de elementos que agem como antioxidantes, capazes de reagirem com oxigénio e formar um complexo que impede a interacção com o biodiesel.

Estes resultados estão em conformidade com o estudo realizado por JeyaKumar *et al.* (2022), ao avaliar experimentalmente os efeitos de antioxidantes naturais na estabilidade a oxidação de mistura binária de biodiesel, verificou que abaixa estabilidade oxidativa das amostras de biodiesel em comparado com amostra do diesel fóssil, devido ausência de elementos ou substâncias capazes de reagir com oxidantes e consequentemente dificulta a interacção com esteres.

As percentagens nas taxas de germinação das sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, para os tratamentos com contaminação mostraram nenhuma germinação no periodo de sete dias, e aos catorze dias, a percentagem de germinação foi igual ou inferior a 50% para BV, BVR e BF. Estes resultados refletem a interferência do diesel e biodiesel nos primeiros catorze dias de contaminação devido a maior área de contacto das sementes com diesel e biodiesel que causou a desidratação excessiva das sementes o que dificultou a germinação das mesmas. Estas

observações vão em conformidade com os resultados obtidos por Silva (2016) e por Martins (2022). O contaminante pode afectar o solo, incluído abundância e a diversidade microbiana (Hawrot-Paw *et al.*, 2020).

Para Mitter *et al.* (2021), ao avaliar impacto da contaminação por diesel e biodiesel na actividade e na estrutura da comunidade microbiana do solo, a análise dos biomarcadores de ácidos gordos fosfolipídicos revelou que a estrutura da comunidade microbiana foi afetada principalmente pelo diesel e biodiesel, seguido pelo tipo de solo.

O impacto do diesel e do biodiesel sobre o número e actividade dos microrganismos no solo não é conclusivo, o número de microrganismos no solo contaminado muda ao longo do tempo (Hawrot-Paw *et al.*, 2020), a não germinação das sementes, o não desenvolvimento das sementes e alterações fisiológicas indicam a presença de produtos químicos perigosos no solo (Ambaye *et al.*, 2022).

As observações nas TAL, IAF e TCC indicam maior actividade metabólica nos tratamentos BFR, BVR e BGR. Estes resultados estão relacionados com facilidade de degradação das amostras do biodiesel e a capacidade dos fungos sintetizarem enzimas lipolíticas como as lípases e as carboxilesterases.

Os resultados acima estão em concordância com as observações do estudo realizado por Bucker *et al.* (2018), ao avaliar a comunidade microbiana deterriogénica por métodos não cultiváveis durante o armazenamento de diesel, biodiesel e misturas (B5, B10, B50) verificou-se maior percentagem de degradação de ésteres de ácidos gordos nas misturas B5 e para os alcanos nas misturas de B50.

Para tratamento DFR os resultados não foram satisfatórios, estes resultados estão sujeito a incapacidade dos fungos sintetizarem enzimas específicas para diesel em grande escala, o que resulta em longos períodos de tempo para degradação das amostras do diesel, para além de que os produtos resultantes da oxidação das amostras do diesel em substâncias biodisponíveis possuem um potencial toxico.

Apesar da incapacidade dos fungos sintetizarem enzimas específicas ao diesel observou-se diferenças não significativas entre DF e DFR, esta observação pode estar associado acção de uma enzima não especifica proveniente de outra via metabólica alternativa.

Os resultados acima vão de acordo com estudo realizado por Medaura *et al.* (2021), ao avaliar o potencial da bioaumentação de fungos nativos como estratégia para promover a biorremediação de um solo envelhecido industrialmente, poluído e enriquecido com frações pesadas de hidrocarbonetos. Observou-se que o total de hidrocarbonetos de petróleo diminuiu $39.90 \pm 1.99\%$ em experimentos bioaumentado com fungos após 120 dias, diferente do controle que apresentou apenas $2.69 \pm 0.13\%$. A eficiência de degradação do contaminante depende da espécie microbiana a ser utilizada e a especificidade da enzima ao substrato (Mitter *et al.*, 2021).

Para o estudo realizado por Chen *et al.* (2020), ao avaliar o efeito da matéria orgânica do solo na degradação de hidrocarbonetos de petróleo em solo contaminado com óleo diesel, os resultados mostram que, os fungos que não possuem enzimas lignolíticas podem remediar PAHs por causa da sua capacidade de sintetizar enzimas não específicas que podem degradar ampla gama de substrato. Este estudo sugere que os fungos são essenciais na biorremediação de solos contaminados por diesel.

Certos microrganismos possuem enzimas como proteases, lipases, hidrolases e celulasas que quebram macromoléculas, apesar da sua natureza inespecífica em certos consórcios, a sua adição reduz a carga total do contaminante (Herrero e Stuckey, 2015). Não implica necessariamente uma actividade metabólica relevante, mas fazem parte de um grupo específico que pode ser adaptado para distintas estruturas de hidrocarbonetos (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2018).

Apesar de que melhor desenvolvimento na estrutura radicular de *Vigna unguiculata* (L.) Walp foi observado aos 60 dias, os tratamentos DF e DFR apresentaram uma camada viscosa e oleaginosa na superfície da raiz. Esses resultados refletem a dificuldade de oxidação da amostra do diesel fóssil e a dificuldade dos fungos metabolizarem diesel, apesar do intervalo de 21 dias desde a contaminação até germinação de todos os tratamentos.

Os resultados acima vão de acordo com as conclusões de Bona *et al.* (2011), ao avaliar o efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), concluiu que as plântulas sofreram alterações morfológicas na raiz, e que o intervalo de tempo entre a contaminação e a semeadura interfere no grau da alteração. Os solos contaminados apresentam um aumento na actividade microbiana após 14 a 21 dias seguido por uma diminuição (Mitter *et al.*, 2021).

As diferenças nas percentagens de crescimento de espécie vegetal de *Vigna unguiculata* (L.) Walp depende do tipo de combustível, a distribuição e a disponibilidade, além de microrganismos com capacidade metabólica específicas.

Os resultados apresentados estão em conformidade com as conclusões dos testes de fitotoxicidade realizados por Hawrot-Paw e IzwiKow (2015), ao avaliar o efeito da fitotoxicidade do biodiesel sobre as sementes de *Lepidium sativum* (agrião de jardim) e *Hordeum vulgare* (cevada de primavera), concluíram que a germinação de sementes, o crescimento e desenvolvimento das plantas testadas apresentaram sensibilidade diversa a presença do diesel e do biodiesel, e a toxicidade é directamente proporcional a quantidade do combustível e a sua resistência a oxidação.

Pohren (2015) destaca a necessidade de monitoramento de espécies químicas derivados da degradação do contaminante, estes compostos são responsáveis por aumentar a toxicidade e mutagenicidade. Para Medaura *et al.* (2021), o citocromo P₄₅₀ e as lacases desempenham um papel muito importante na biorremediação fúngica de hidrocarbonetos sem aumentar o risco ao meio ambiente.

Os valores de P value foram calculados no contexto de dar significância as hipóteses nulas (H₀) com a finalidade de afirmar que não há efeito na contaminação do solo com diesel e biodiesel, e na utilização dos fungos que formam o bolor de pão, sob a suposição de que a hipótese nula era verdadeira.

A separação do significativo em relação o não significativo ignora o facto de que o menor valor de P value fornece provas convincentes contra a hipótese nula, o que possibilita concluir que os resultados de não significativo indicam que não há evidências suficientes contra as hipóteses nulas. Para além do P não transmitir o tamanho do efeito causado pelo diesel, biodiesel e pelos fungos, não transmite a importância experimental dos efeitos observados.

6. Conclusão Limitações e Recomendações

6.1 Conclusão

As propriedades físico-químicas das amostras de combustíveis encontram-se amplamente variados, no geral a amostra de diesel fóssil apresentou valores baixo de viscosidade e densidade em relação as outras amostras de biocombustíveis, para índice de acidez os valores foram intermediários em relação as amostras de biodiesel vegetal e biodiesel de fritura.

No caso da estabilidade oxidativa das amostras, o diesel fóssil apresentou o valor mas alto, seguido por biodiesel de fritura e as amostras de biodiesel de gordura e biodiesel vegetal apresentaram valores não satisfatórios, o que pode indicar que as amostras de combustíveis não podem apresentar alta resistência ao processo de oxidação e ser simultaneamente fácil biodegradáveis.

A taxa de germinação das sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, nos períodos de sete a catorze dias, os resultados não foram satisfatórios comparado com controle, o que podem indicar maior período de adaptação dos fungos aos vasos contaminados, estes resultados estão associados a vários factores como a presença do contaminante, afinidade das enzimas pelo contaminante e dificuldade dos fungos de se multiplicarem ou de sintetizarem enzimas que facilitem a conversão do contaminante, visto que os valores satisfatórios foram observados após o período de catorze dias.

Os valores da taxa de assimilação líquida, de índice de área foliar e a taxa de crescimento da cultura nos períodos de 4 a 8 semanas, os resultados mostram maior adaptabilidade da planta de *Vigna unguiculata* (L.) Walp nos tratamentos de S.C, BV, BVR, BG, BGR, BF, BFR com exceção dos tratamentos DF e DFR, devido alta resistência a oxidação e elevada concentração do contaminante, o que dificultou a bioconversão do diesel em compostos biodisponíveis.

Entre os tratamentos DF e DFR verificou-se maior adaptabilidade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp no tratamento DFR associado a utilização de enzimas alteradas temporariamente proveniente de uma rota metabólica primaria, secundaria ou de qualquer outra via alternativa, não específica ao diesel. Os resultados de correlação entre índice de área foliar e o período de indução das amostras reforçam baixa eficiência dos fungos *Rhizopus ssp*, *Mucor ssp*, *Aspergillus ssp*, *Penicillium ssp* e *Fusarium ssp* (bolor de pão) na biodegradação da amostra do diesel fóssil.

6.2 Limitações do estudo

- Não foi levado em consideração a influência do solo, visto que há a presença de elementos e substâncias químicas, podem se ligar ao sítio activo das enzimas hidrólases, assim impedir a interacção com o contaminante;
- Não foi levado em consideração a capacidade dos fungos inoculados resistirem ao stress causado pela presença do contaminante e o tempo de sobrevivência das espécies envolvidas no processo de bioaugmentação;
- Não foi avaliado o efeito do diesel, biodiesel e dos derivados resultantes da biodegradação sobre a planta de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, utilizados como bioindicador de fitotoxicidade;
- Não foi levado em consideração a capacidade catalítica das enzimas no solo, visto que algumas enzimas possuem um sítio específico de actuação, onde as condições são favorável actividade catalítica.

6.3 Recomendações

- Utilizar diferentes texturas de solos, com o fim de estabelecer a influência do solo sobre os fungos pertencentes aos géneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (bolor de pão) no processo de biodegradação das amostras de diesel e biodiesel e determinar a composição química do diesel e biodiesel ao longo do tempo a fim de identificar afinidade enzimática;
- Caracterizar as comunidades microbiana presente no meio e as propriedades físico-químicas do solo antes e depois do experimento;
- Avaliar o efeito do diesel, biodiesel e derivados da biodegradação sobre as plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp utilizados como bioindicador, de modo a determinar o efeitos anatómicos-morfológicos a, fisiológicos e genéticos.
- Avaliar actividade enzimática nos solos contaminados com diesel e biodiesel, quantificar, determinar as enzimas lipolíticas presentes no meio e a quantidade de ésteres presentes no solo ao longo tempo, a fim de estabelecer o tempo necessário para biodegradação significativa do diesel e do biodiesel.

7. Referência Bibliográficas

- Adeola, A. O., A. S. Akingboye., O. T. Ore., O. A. Oluwajana., A. H. Adewole., D. B. Olawade e A. C. Oguntimele. (2022). Crude oil exploration in Africa: socio-economic implications, environmental impacts, and mitigation strategies. *Environment Systems and Decisions*, 42 (1): 26-50.
- Agência nacional do petróleo - ANP. (2019). Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. - Rio de Janeiro.
- Aguiar, R. T. (2013). *Avaliação física, química e microbiológica do diesel, biodiesel e suas misturas durante a logística de distribuição*.
- Al Mousa, A. A., N. F. Abo-Dahab., A. M. Hassane., A. E. R. F. Gomaa., J. A. Aljuriss e N. D. Dahmash. (2022). Harnessing *Mucor spp.* for Xylanase Production: Statistical Optimization in Submerged Fermentation Using Agro-Industrial Wastes. *BioMed Research International*, 2022(1): 3816010.
- Ambaye, T. G., A. Chebbi., F. Formicola., A. Rosatelli., S. Prasad., F. H. Gomez e M. Vaccari. (2022). Ex-situ bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil using mixed stimulants: Response and dynamics of bacterial community and phytotoxicity. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(6): 108814.
- Ameen, F., M. Moslem., S. Hadi e A. E. Al-Sabri. (2016) Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci*, 23, 211.
- Ângelo, J. F. (2016). *Síntese e caracterização do biodiesel obtido de óleo de fritura e suas misturas com o óleo de Jatropha Curcas*. Tese de Mestrado. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.
- Azañero, A. J. E. V., M. A. V. Riega., S. V. Chávez., D. K. M. Caja e F. D. C. Gutierrez. (2024). Métodos para determinar la actividad enzimática en suelos contaminados. *South Sustainability*, 5(1): e092-e092.
- Barreto, G. G. (2018). *Caracterização morfológica de Fusarium spp. do feijão fava e controle biológico via sementes-plântulas*
- Bezerra, J. D., C. C. Nascimento., R. D. N. Barbosa., D. C. D. Silva., V. M. Svedese., E. B. Silva-Nogueira e C. M. Souza-Motta. (2015). Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: *Diversity and biotechnological potential*. *Brazilian Journal of microbiology*, 46(1): 49-57.

- Bona C, B. M. Silva., I. M. Rezende., G. O. Santos., L. A. Souza e R. C. Inckot . (2011) Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 25: 277–285.
- Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*, 26(1): 73-81.
- Buckner, F., T. M. de Moura., M. E. da Cunha., P. D. de Quadros., S. A. Beker., J. C. Cazarolli e F. M. Bento. (2018). Evaluation of the deterring microbial community using qPCR, n-alkanes and FAMES biodegradation in diesel, biodiesel and blends (B5, B10, and B50) during storage. *Fuel*, 233: 911-917.
- Cardona-Ayala, C., A. Jarma-Orozco., H. Araméndiz-Tatis., M. Peña-Agrosott e C. Vergara-Córdoba. (2014). Respuestas fisiológicas y bioquímicas del frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) bajo déficit hídrico. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(2): 250-261.
- Cardoso, A. L. (2011). *Catalisadores heterogêneos a base de heteropoliácidos e estanho para produção de biodiesel*.
- Chai, M., Q. Tu., M. Lu e Y. J. Yang. (2014). Esterification pretreatment of free fatty acid in biodiesel production, from laboratory to industry. *Fuel processing technology*, 125: 106-113.
- Chen, Y. A., P. W. G. Liu., L. M. Whang., Y. J. Wu e S. S. Cheng. (2020). Effect of soil organic matter on petroleum hydrocarbon degradation in diesel/fuel oil-contaminated soil. *Journal of bioscience and bioengineering*, 129 (5): 603-612.
- Correa, C. (2021). *Metodologias analíticas para avaliar a biodegradabilidade do diesel, biodiesel e blendas B10*. Tese de Doutorado. Rio Grande do Sul, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul.
- Cortez, D. V., H. F. D. Castro e G. S. Andrade. (2017). Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. *Química nova*, 40: 85-96.
- Cruz, J. M., P. R. M. Lopes., R. N. Montagnolli., I. S. Tamada., N. M. Silva., e E. D. Bidoia. (2013). Toxicity assessment of contaminated soil using seeds as bioindicators. *J Appl Biotechnol*, 1(1): 1-10.
- Dantas, T. B. (2013). *Atividade antifúngica in vitro de timol sobre cepas do gênero *Penicillium**.

- Da Silva Castro, L e A. G. Barañano. (2019). Produção de biodiesel, métodos, perspectivas para o Brasil—uma revisão. *Revista Liberato*, 20(33): 41-56.
- Da Silva, J. K. P. D., A. Lazuta., D. M. Sampaio., C. M. Pinheiro., A. P. Leite e M. S. Quadro. (2023). Avaliação toxicidade de efluentes da indústria de beneficiamento de leite através de bioindicador vegetal.
- De França Ferreira, C. C., J. G. Fernandes., G. M. Campos-Takaki e R. F. da Silva Andrade. (2023). Allelopathic effect of extracts of *Salicornia neei* Lag. In the germination of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.). *Seven Editora*.
- De Oliveira, A. M. C., B. MELO NETO., M. D. M. ROCHA., M. R. da Silva e de M. R. Oliveira. (2021). Produção de alimentos na base do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*): importância nutricional e benefícios para a saúde.
- Deshmukh, R., A. A. Khardenavis e H. J. Purohit. (2016). Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian journal of microbiology*, 56: 247-264.
- Dib, F. H. (2010). *Produção de biodiesel a partir de óleo residual reciclado e realização de testes comparativos com outros tipos de biodiesel e proporções de mistura em um moto-gerador*.
- Dos Santos, S. R. M., K. B. dos Santos e D. R. de Castro., (2019). Estudo dos estágios de vida do fungo *Rhizopus stolonifer*: iniciação a prática laboratorial dentro da Engenharia. *Revista Sertão Sustentável*, 1(2): 130-140.
- Durairaj, P., J. S. Hur e H. Yun. (2016). Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microbial cell factories*, 15(1): 1-16.
- EN 14214 (2003). European Standard: Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of Oxidation stability (accelerated oxidation test). *European Committee for Standardization*, Brussels.
- Encinar, J. M., N. Sánchez., G. Martínez e L. García. (2011). Study of biodiesel production from animal fats with high free fatty acid content. *Bioresource Technology*, 102(23): 10907-10914.
- Encinar, J. M., S. Nogales-Delgado e N. Sánchez. (2021). Pre-esterification of high acidity animal fats to produce biodiesel: A kinetic study. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(4): 103048.
- Fan, Y. Y., G. C. Wang., J. H. Fu e X. H. Zheng. (2012). Bioremediation of waste drilling fluid: comparison of biostimulation and bioaugmentation. *Desalination and Water Treatment*, 48(1-3): 329-334.

- Filho, M. S. C., O. Gonçalves., C. R. A. Santos., O. M. C. Oliveira e Í. T. A. Moreira. (2021). Technological Scenario of Hydrocarbon Bioremediation Assisted by the Use of Fungi and Plant Extracts: Technological Prospecting. *Cadernos de Prospecção – Salvador*, 2: 534-547.
- Freire, F. C. J. (2016). *Características fisiológicas de mudas de Craibeira sob condições de deficiência hídrica*. Dissertação de Mestrado. Rio Largo. Universidade Federal de Alagoas.
- Freitas, N. M. R. (2014). *Produção de Biodiesel a partir de diversas matérias-primas: um estudo comparativo*. Dissertação do Mestre. Coimbra. Instituto Superior de Engenharia de Coimbra.
- Go, A. W., S. Sutanto., L. K. Ong., P. L. Tran-Nguyen., S. Ismadji e Y. H. Ju. (2016). Developments in in-situ (trans) esterification for biodiesel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 60: 284-305.
- Gottschalk, G. e G. Gottschalk. (1986). Regulation of bacterial. Springer New York, 2: 143-162.
- Hassan, A., S. Z. Ilyas., A. Jalil e Z. Ullah. (2021). Monetization of the environmental damage caused by fossil fuels. *Environmental Science and Pollution Research*, 28: 21204-21211.
- Hawrot-Paw, M., A. Koniuszy., G. Zając e J. Szyszlak-Bargłowicz. (2020). Ecotoxicity of soil contaminated with diesel fuel and biodiesel. *Scientific Reports*, 10(1): 16436.
- Hawrot-Paw, M., e M. Izwikow. (2015). Ecotoxicological Effects of Biodiesel on Soil. *Journal of Ecological Engineering*, 16(5): 34-39.
- Hazrat, M. A., M. G. Rasul., M. M. K. Khan., M. Mofijur., S. F. Ahmed., H. C. Ong., e P. L. Show. (2021). Techniques to improve the stability of biodiesel: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19: 2209-2236.
- Hernández-López, E. L., L. Perezgasga., A. Huerta-Saquero., R. Mouriño-Pérez e R. Vazquez-Duhalt. (2016). Biotransformation of petroleum asphaltenes and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Neosartoryafischeri*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(11): 10773-10784.
- Hernández-Ortega, H. A., P. A. Quintanar-Isaías., A. T. Jaramillo-Pérez., A. Alarcón., R. Ferrera-Cerrato e R. Lazzarini-Lechuga. (2014). Diesel effects on root hydraulic conductivity and morphological changes of the vascular cylinder in *Medicago sativa*. *Environmental and experimental botany*, 105: 1-9.

- Henning, A. A. e A. A. Henning, A. A. (2015). *Guia prático para identificação de fungos mais frequentes em sementes de soja*.
- Herrero, M e D. C. Stuckey. (2015). Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, 140: 119-128.
- Ho, S. H., Y. D. Wong e V. W. C. Chang. (2014). Evaluating the potential of biodiesel (via recycled cooking oil) use in Singapore, an urban city. *Resources, conservation and recycling*, 91: 117-124.
- Jardim Botânico UTAD. Disponível em:
https://jb.utad.pt/especie/Vigna_unguiculata. Acesso 9 de outubro de 2024.
- Jeyakumar, N., Z. Huang., D. Balasubramanian., A. T. Le., X. P. Nguyen., P. L. Pandian., e A. T. Ho ang. (2022). Experimental evaluation over the effects of natural antioxidants on oxidation stability of binary biodiesel blend. *International Journal of Energy Research*, 46(14): 20437-20461.
- Karavalakis, G., S. Stournas., e D. Karonis. (2010). Evaluation of the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. *Fuel*, 89(9): 2483-2489.
- Kawentar, W. A e A. Budiman. (2013). Synthesis of biodiesel from second-used cooking oil. *Energy Procedia*, 32: 190-199.
- Khanafer, M., H. Al-Awadhi e S. Radwan. (2017). Coliform bacteria for bioremediation of waste hydrocarbons. *BioMed research international*, 2017(1): 1838072.
- Kumar, N. (2017). Oxidative stability of biodiesel: Causes, effects and prevention. *Fuel*, 190: 328-350.
- Lima, J. R. C. (2017). *Aplicação de eletro-reabilitação a solos contaminados com tricloroetileno*. Dissertação de Mestrado. 69f. Porto. Universidade do Porto.
- Leão, L.S. (2009). *Estudo Empírico e Cinético da Esterificação de álcoois graxos saturados sobre o Ácido Nióbico*. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Longanesi, L., A. P. Pereira., N. Johnston e C. J. Chuck. (2022). Oxidative stability of biodiesel: recent insights. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 16(1): 265-289.
- López Herrera, J. A. (2014). *Diseño y construcción de un viscosímetro de escurrimiento, para el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la FIQ-UNAC*.
- Ma, F e M. A. Hanna. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource technology*, 70(1): 1-15.

- Margesin, R., G. Feller., M. Hämmerle., U. Stegner eF. Schinner. (2002). A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. *Biotechnology letters*, 24: 27-33.
- Martins, J. C. D. S. (2022). Efeitos do óleo diesel na germinação e crescimento de propágulos de *Rhizophora mangle* L., *Avicennia germinans* (L.) L. e *Laguncularia racemosa* CF Gaertn.
- Massola Júnior, N. S. (2018). *Fungos fitopatogênicos. Manual de fitopatologia: princípios e conceito.*, 1.
- Medaura, M. C., M. Guivernau., X. Moreno-Ventas., F. X. Prenafeta-Boldú e M. Viñas. (2021). Bioaugmentation of native fungi, an efficient strategy for the bioremediation of an aged industrially polluted soil with heavy hydrocarbons. *Frontiers in Microbiology*, 12: 626436.
- Medeiros, J. G. D. F. e L. A. Ramos. (2019). *Energia Eólica: Avaliação de Implementação de um Parque Eólico em Goianésia-GO.*
- MEDEIROS, A. M. C. D. S. (2020). *Avaliação da resistência de genótipos crioulos de feijão-caupi Vigna unguiculata (L.) Walp. ao ataque de Callosobruchus maculatus (Fabr., 1775)(Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae).*
- Mendes, L. F. B. (2015). *Produção de biodiesel, situação atual e perspectivas futuras.* Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Mitter, E. K., J. J. Germida e J. R. de Freitas, J. R. (2021). Impact of diesel and biodiesel contamination on soil microbial community activity and structure. *Scientific reports*, 11(1): 10856.
- Mohammadi-Sichani, M. E., M. Mazaheri-Assadi., A. Farazmand., M. Kianirad., A. M. Ahadi e H. Hadian-Ghahderijani. (2019). Ability of *Agaricusbisporus*, *Pleurotusostreatus* and *Ganodermalucidum* compost in biodegradation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16: 2313-2320.
- Moraes, U. D. N. (2021). *Identificação de fungos anemófilos de ambientes climatizados em laboratórios de pesquisa de uma instituição de ensino superior de Alagoas.*
- Murta Valle, M. L., R. S. Leonardo e J. Dweck, J. (2014). Comparative study of biodiesel oxidation stability using Rancimat, PetroOXY, and low P-DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 116: 113-118.

- Nascimento, C. S.; V. L. dos Santos e Andrade, M. H. C. (2014). *Análise da produção de protease e lipase por fungos filamentosos isolados do fruto da macaúba (acrocomia aculeata (jacq) lood. Ex mart).*
- Nascimento, S. S. (2019). *Tratamento de efluente industrial oleoso por Cunninghamella bertholletiae*. Dissertação de Mestrado. Pernambuco. Universidade Federal de Pernambuco.
- Nakatani, M., Y. Takehara., H. Sugino., M. Matsumoto., O. Hashimoto., Y. Hasegawa e K. Tsuchida. (2008). Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *The FASEB journal*, 22(2): 477-487.
- Oliboni, G. M. (2022). *Identificação e perfil de sensibilidade de Aspergillus spp. presente no ar atmosférico*. Dissertação de Doctorado. São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
- Oliveira, H. S. (2020). *Efluente oleoso como alternativa para a produção de lipase por fungos*. Dissertação de Mestrado. Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco.
- Patrique Junior, P. T. (2021). *Reciclagem do óleo vegetal de fritura para a síntese de biodiesel de alto rendimento: Otimização do rendimento da reação de transesterificação*. Tese de Licenciatura. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.
- Petróleo Brasileiro S.A - Petrobras. Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ, 2011. Disponível em: <http://br.com.br/wcm/connect/11b37d2a-a690-453d-9602-7c7d594da448/fispq-comboleodiesel-auto-oleodiesel-b-s500-petrobras-grid.pdf?MOD=AJPERES&CVID=ILFsz2>. Acesso em 17 Abril. 2023.
- Pohren, R. S. (2015). *Biorremediação de HPAs em solo de área contaminada: riscos mutagênicos e degradação química*. Tese de doutorado. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Prenafeta-Boldú, F. X., G. S. De Hoog e R. C. Summerbell. (2018). Fungal communities in hydrocarbon degradation. *Microbial Communities Utilizing Hydrocarbons and Lipids: Members, Metagenomics and Ecophysiology*. McGenity, TJ, Ed: 1-36.
- Ramos, L. P., F. R. da Silva., A. S. Mangrich e C. S. Cordeiro. (2011). Tecnologias de produção de biodiesel. *Revista virtual de química*, 3(5): 385-405.

- Ramos-Sánchez, L. B., M. C. Cujilema-Quitio., M. C. Julian-Ricardo., J. Cordova e P. Fickers. (2015). Fungal lipase production by solid-state fermentation. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 5(2): 1.
- Rigo, D., L. Gayeski., G. A. Tres., F. D. Camera., J. Zeni., E. Valduga e G. T. Backes. (2021). Microbiological Production of Enzymes: A Review. *Brazilian Journal of Development*, 7(1): 9232-9254.
- Rodrigues, C., S. T. A. Cassini., P. W. P. Antunes., L. M Pinotti., R. de Pinho Keller e R. F. Gonçalves. (2016). Lipase-producing fungi for potential wastewater treatment and bioenergy production. *African Journal of Biotechnology*, 15(18): 759-767.
- Santa Catarina. Universidade Federal de Santa Catarina. Sperb, J. G. C., T. M. Costa., D. A. Vaz., J. A. B. Valle., R. D. C. S. C. Valle e L. B. B. Tavares. (2015). Análise qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. *Engevista*, 17 (3): 385-397.
- Santos, A. S., Moreno, T. F. Moreno., L. C. V. Cavalcante., Amorim, E. L. C. Amorim e D. G. Coelho. (2021). Study of the bioremediation process in soils impacted by oil spills. *Diversitas Journal. Santana do Ipanema/AL*. 6(1): p.823-835.
- Santos-Castellanos, M., M. Segura Abril e C. E. Nustez Lopez. (2010). Analisis de crecimiento y relacion fuente-demanda de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el municipio de Zipaquirá (Cundinamarca, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(1): 5253-5266.
- Schultz, F. M. (2010). Avaliação de microrganismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel.
- Silva, N. C. (2021). Biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo em solos contaminados por combustíveis. Dissertação de Mestrado. Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Simplício, S. F. (2015). Características de crescimento e produção de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Sob aplicação de herbicidas.
- Soares, E. N. D. S. (2020). Remediação e biorremediação de solos contaminados. Dissertação do bacharelado. Minas Gerais. Universidade de Uberlândia.
- Solarin, S. A. (2020). An environmental impact assessment of fossil fuel subsidies in emerging and developing economies. *Environmental Impact Assessment Review*, 85: 106443.
- Souza, D. R. D., G. A. Souza., I. F. B. Araujo., L. M. Pereira., V. S. Bezerra e R. B. Marques. (2017). Efeitos tóxicos dos fungos nos alimentos. *Revinter*, 10(2): 73-84.

- Sousa, K. C., J. E. S. Júnior e V. M. L. Santos. (2020). Prospective Study About the Use of the Bioremediation Technique for the Recovery of Contaminated Soil by Oil Derivatives. *Cadernos de Prospecção – Salvador*, 3: 795-804.
- Tamada, I. S., R. N. Montagnolli., P. R. Lopes e E. D. Bidoia. (2012). Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43: 1576-1581.
- Tomalá, S. e R. Wilson. (2021). *Fitorremediación: una alternativa para reducir la contaminación por Hidrocarburos en Ecuador*. Bachelor's thesis. La Libertad, Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Vaz, M. e A. Choupina. (2012). Lipases: biocatalizadores da hidrólise de triacilglicerois. *REB-Revista Eletrônica de Biologia*, 5(3): 42-58.
- Vieira, S. S. (2011). *Produção de biodiesel via esterificação de ácidos graxos livres utilizando catalisadores heterogêneos ácidos*. Dissertação de Mestrado. Lavras. Universidade Federal de Lavras.
- Villalobos Flórez, J. G. e G. A. Niño Céspedes. (2020). *Caracterización de Consumo de Hidrocarburos Totales de Petróleo y Fijación de Nitrógeno Atmosférico por Kribbella sp Nativa del Piedemonte Llanero*. Doctoral dissertation. Universidad Santo Tomás.
- Yang, H., F. Yu., Z. Qian., T. Huang., T. Peng e Z. Hu. (2024). Cytochrome P450 for environmental remediation: catalytic mechanism, engineering strategies and future prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(1), 33
- Zañão, L. R. (2019). *Desenvolvimento de método para previsão de parâmetros físico-químicos do óleo diesel comercial por cromatografia gasosa ultrarrápida*. Tese de Doutorado. Araraquara-SP, Universidade Estadual Paulista.
- Zhou, J., Y. Xiong e Y. Shi. (2016). Antioxidant consumption kinetics and shelf-life prediction for biodiesel stabilized with antioxidants using the Rancimat method. *Energy and Fuels*, 30(12): 10534-10542.

8. Anexos

Anexo 1. Parâmetros de crescimento fisiológicos e o período de indução.

Contaminação	Período de Indução (h)	Taxa de germinação (7 dias)	Taxa de germinação (14 dias)	TAL (mg*cm ⁻² .semana ⁻¹) 30dias	TAL (mg*cm ⁻² *semana ⁻¹) 60 dias	IAF cm.g 30 dias	IAF cm.g 60 dias	TCC g.m.semana 30 dias	TCC g.m.s 60 dias
S.C	0	1	1	1,7542	1,5466	0,3055	0,3354	0,5359	0,5187
S.C	0	0,75	1	0,8683	0,8183	0,1115	0,5622	0,0968	0,4601
S.C	0	0,5	1	0,9469	1,4756	0,4372	0,225	0,414	0,332
BVR	0,22	0	0,25	1,4197	1,3899	0,3037	0,512	0,4312	0,7117
BVR	0,28	0	0	1,5641	1,1661	0,3255	0,7764	0,5093	0,9054
BVR	0,96	0	0	1,3925	1,4972	0,3164	0,5432	0,4406	0,8132
BGR	1,33	0	0	1,3099	1,4116	0,495	0,6718	0,648	0,9484
BGR	1,06	0	0	0,9504	0,9118	0,3534	0,8584	0,3359	0,7828
BGR	3,53	0	0	1,7063	2,2186	0,2518	0,437	0,4296	0,9695
BFR	1,71	0	0	1,3267	1,4441	0,239	0,4771	0,3171	0,689
BFR	5,3	0	0	1,5374	1,7259	0,3313	0,2848	0,5093	0,4929
BFR	2,81	0	0	1,3127	1,5212	0,3285	0,4807	0,4312	0,7312
DFR	19,38	0	0	1,9117	1,0798	0,1757	0,3354	0,3359	0,3621
DFR	21,29	0	0	2,7332	1,4776	0,0686	0,442	0,1875	0,6531
DFR	25,08	0	0	2,9698	0,8285	0,0352	0,231	0,1046	0,1914
BV	0,22	0	0,25	1,4971	1,6792	0,1523	0,4015	0,2281	0,6742
BV	0,28	0	0	1,1799	2,5106	0,2661	0,2921	0,314	0,7335
BV	0,96	0	0	2,0797	2,3471	0,0548	0,0965	0,114	0,2265
BG	1,33	0	0	1,9125	1,4791	0,125	0,348	0,239	0,5148
BG	1,06	0	0	1,5318	1,3756	0,2101	0,69	0,3218	0,9492
BG	3,53	0	0	1,6363	1,8077	0,1289	0,258	0,2109	0,4664
BF	1,71	0	0,5	1,2469	1,228	0,1265	0,6399	0,1578	0,7859
BF	5,3	0	0	9,7147	1,8408	0,0175	0,2088	0,1703	0,3843
BF	2,81	0	0	1,1688	1,4486	0,1925	0,1175	0,225	0,1703
DF	19,38	0	0	1,7032	0,932	0,1421	0,3017	0,2421	0,2812
DF	21,29	0	0	2,7792	1,3622	0,0714	0,4158	0,1984	0,5664
DF	25,08	0	0	2,0202	0,6495	0,1113	0,2261	0,225	0,1468

Anexo 2. Resultados de estabilidade oxidativa

ID 1	ID 2	Determination date	Temperature	Induction time	Evaluation
Biodiesel gordura 1	R1	13.03.2023 23:30:22	110°C	1.33 h	1
Biodiesel Gordura 2	R2	13.03.2023 23:30:25	110°C	1.06 h	1
Biodiesel gordura 3	R3	13.03.2023 23:30:27	110°C	3.53 h	1
Biodiesel gordura 4	R4	13.03.2023 23:30:30	110°C	0.70 h	1
Biodiesel de fritura	R1	14.03.2023 20:38:13	110°C	1.71 h	1
Biodiesel de fritura	R2	14.03.2023 20:38:15	110°C	0.54 h	1
Biodiesel de fritura	R3	14.03.2023 20:38:16	110°C	5.30 h	1
Biodiesel de fritura	R4	14.03.2023 20:38:18	110°C	2.81 h	1
Biodiesel vegetal 1	R1	16.03.2023 21:08:03	110°C	0.22 h	1
Biodiesel Vegetal 2	R2	16.03.2023 21:08:04	110°C	0.28 h	1
Biodiesel Vegetal 3	R3	16.03.2023 21:08:06	110°C	- h	1
Biodiesel Vegetal 4	R4	16.03.2023 21:08:07	110°C	0.96 h	1
Diesel 1-3	R1	24.03.2023 20:17:54	110°C	10.55 h	1
Diesel 2-3	R2	24.03.2023 20:17:55	110°C	19.38 h	1
Diesel 3-3	R3	24.03.2023 20:17:56	110°C	21.29 h	1
Diesel 4-3	R4	24.03.2023 20:17:57	110°C	25.08 h	1

Anexo 3. Parâmetros de crescimento de *Vigna unguiculata*.

Tratamentos	Tempo em dias	Área foliar (cm ² /V)	Área do solo (m ² /V)	Peso seco total (g/V)	Tempo em dias	Área foliar (cm ² /V)	Peso seco total (g/V)
Controlo (SC)	30	61.1	0.16	0.343	60	41.2	0.664
Controlo (SC)	30	35.7	0.16	0.062	60	42.8	0.589
Controlo (SC)	30	46.6	0.16	0.256	60	40.0	0.425
Biodiesel de fritura (BF)	30	40.5	0.16	0.101	60	48.76	1.006
Biodiesel de fritura (BF)	30	5.6	0.16	0.109	60	18.5	0.492
Biodiesel de fritura (BF)	30	30.8	0.16	0.144	60	18.81	0.218
Biodiesel de gordura (BG)	30	40.0	0.16	0.153	60	46.4	0.659
Biodiesel de gordura (BG)	30	33.6	0.16	0.206	60	48.0	1.215
Biodiesel de gordura (BG)	30	41.2	0.16	0.135	60	34.4	0.597
Diesel fóssil (DF)	30	22.7	0.16	0.155	60	24.1	0.360
Diesel fóssil (DF)	30	19.0	0.16	0.127	60	30.2	0.725
Diesel fóssil (DF)	30	17.8	0.16	0.144	60	24.12	0.188
Biodiesel vegetal (BV)	30	48.76	0.16	0.146	60	29.2	0.863
Biodiesel vegetal (BV)	30	32.76	0.16	0.201	60	40.0	0.939

Avaliação da biodegradação do diesel e biodiesel por fungos *Rhizopus ssp.*, *Mucor ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Penicillium ssp* e *Fusarium ssp*: *Vigna unguiculata* como bioindicador de fitotoxidade

Biodiesel vegetal (BV)	30	9.75	0.16	0.073	60	11.8	0.290
Diesel fóssil+ R (DFR)	30	31.24	0.16	0.215	60	33.5	0.463
Diesel fóssil+ R (DFR)	30	15.6	0.16	0.120	60	41.6	0.836
Diesel fóssil+ R (DFR)	30	14.1	0.16	0.067	60	30.8	0.245
Biodiesel de gordura + R (BGR)	30	49.5	0.16	0.415	60	43.0	1.214
Biodiesel de gordura + R (BGR)	30	43.5	0.16	0.215	60	57.2	1.002
Biodiesel de gordura + R (BGR)	30	40.29	0.16	0.275	60	34.9	1.241
Biodiesel de fritura + R (BFR)	30	38.25	0.16	0.203	60	40.1	0.882
Biodiesel de fritura + R (BFR)	30	53.01	0.16	0.326	60	45.5	0.631
Biodiesel de fritura + R (BFR)	30	35.04	0.16	0.276	60	33.4	0.936
Biodiesel vegetal + R (BVR)	30	32.4	0.16	0.276	60	43.1	0.911
Biodiesel vegetal + R (BVR)	30	52.08	0.16	0.344	60	44.3	1.159
Biodiesel vegetal + R (BVR)	30	33.75	0.16	0.282	60	54.3	1.041

Onde:

R-substratos com fungos

V- vaso