



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E IMUNOLOGIA

JUCIANA CLARICE CAZAROLLI

**SUSCETIBILIDADE DO BIODIESEL DE SEBO BOVINO
À BIODEGRADAÇÃO POR FUNGO**

PORTO ALEGRE – RS

2010

Juciana Clarice Cazarolli

Suscetibilidade do Biodiesel de Sebo Bovino à Biodegradação por Fungo

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Profa. Dra. Fátima Menezes Bento

Porto Alegre – RS

2010

Juciana Clarice Cazarolli

Suscetibilidade do Biodiesel de Sebo Bovino à Biodegradação por Fungo

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovado em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Laiza Canielas Krause

Gelsa Edith Navarro Hidalgo

Fátima Menezes Bento

Dedico esse trabalho a minha família, José, Eliria e Luisa, que nunca mediram esforços para me apoiar, me amar e me preparar para o mundo.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Fátima Menezes Bento, por toda o apoio, amizade e interesse dedicados a mim durante a realização deste trabalho.

Agradeço a Francielle Bucker por todo o suporte que me foi dado, facilitando o trabalho sempre que possível e criticando sempre que necessário.

Agradeço aos colegas de trabalho do Laboratório 209 do ICBS pela amizade e auxílio sempre que precisei.

Agradeço aos meus Pais pelo incentivo constante, pelas lições de vida, pelo suporte emocional e carinho incondicional.

Agradeço a minha Irmã Luisa, por demonstrar ser cada dia um exemplo a ser seguido e motivo de orgulho da caçula aqui.

Agradeço a Eduardo Acker, pelo carinho, apoio, compreensão e paciência que teve comigo nesse meu período de conclusão de curso.

Agradeço à Sonia A. Lugo V., pelos dois anos de convivência no apartamento 204 e por ter se tornado minha irmã emprestada.

Agradeço a meus vários colegas de curso, pela amizade e companheirismo.

Agradeço minhas amigas, pela amizade incondicional.

Agradeço a todos os Professores com quem tive contato em todo o meu período escolar, desde o maternal até o último semestre de faculdade, pois sem os ensinamentos deles eu não teria formado minha personalidade de hoje e nem seria possível estar escrevendo esses agradecimentos.

ARTIGO:

O presente artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Química Nova, apresentadas em anexo no final do trabalho.

Endereço para correspondência:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia.
Rua Sarmiento Leite, 500 sala 158 CEP: 91501970 Porto Alegre, RS Brasil
Telefone: (51) 3308 4497 Homepage: <http://www.icbs.ufrgs.br>

Contato por: jucianacazarolli@gmail.com; fatimabento@yahoo.com

Suscetibilidade de biodiesel de sebo bovino a contaminação por fungo

Juciana Cazarolli*; **Francielle Bucker**; **Fernando Pereira Viscardi**; **Fátima Menezes Bento**.

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 Centro CEP: 90050-170 POA, RS Brasil.

Márcia Cardoso Manique.

Departamento de Ciências dos Materiais, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Campus do Vale, Bairro Agronomia CEP: 91501-970 POA, RS Brasil.

Laiza Canielas Krause; **Gabriela Pereira da Silva Maciel**; **Bruna Onorevoli**; **Elina Bastos Caramao**; **Maria do Carmo Peralba**.

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Campus do Vale, Bairro Agronomia CEP: 91501-970 POA, RS Brasil.

(*) jucianacazarolli@gmail.com

Resumo

As características do biodiesel produzido podem influenciar na suscetibilidade deste combustível à contaminação microbiana, o que tem sido uma freqüente preocupação, visto que esta acarreta em alterações nas propriedades do combustível, durante seu armazenamento. O objetivo do trabalho é comparar o crescimento microbiano no biodiesel de sebo bovino, produzido com NaOH e KOH e purificado por diferentes métodos. O fungo apresentou crescimento em todos os tempos analisados, com destaque para uma maior biomassa observada nos biodiesel produzidos com KOH como catalisador. Outras características desse crescimento são apresentadas e discutidas neste trabalho.

Palavras Chave: biodiesel, gordura animal, armazenamento, contaminação.

Abstract

Susceptibility of biodiesel from tallow to contamination by fungus: The characteristics of biodiesel produced can affect the susceptibility to microbial contamination of the fuel, which has been a frequent concern, as this leads to changes in fuel properties during storage. The objective is to compare the microbial growth in biodiesel from tallow, made with NaOH and KOH and purified using different methods. The fungus grew in all periods analyzed, with emphasis on greater biomass observed in the biodiesel produced using KOH as catalyst. Other features of this growth are presented and discussed here.

Key words: biodiesel, animal fat, storage, contamination.

1. Introdução

O aumento da liberação de CO₂ na atmosfera, considerado um agravante direto do efeito estufa, tem sua principal origem, no Brasil, na queima de combustíveis fósseis e queimadas provocadas pelo desmatamento [1]. Pesquisas na área de combustíveis estão sendo desenvolvidas em busca de alternativas tecnológicas capazes de colaborar com o desenvolvimento sustentável. Tornou-se possível, então, a utilização de matéria prima renovável para fabricação de combustíveis, que diminuem a liberação de CO₂ na sua utilização. Os chamados biocombustíveis, entre eles o biodiesel, tiveram uma grande demanda na sua utilização devido principalmente à Crise do Petróleo de 1970.

A Lei 11.097/2005, aprovada pelo Congresso Nacional em 13 de janeiro de 2005, tornou obrigatória a adição de biodiesel ao diesel de petróleo no Brasil [2]. Inicialmente a proporção de biodiesel adicionada ao diesel era de 2%, denominado B2, sendo obrigatório em janeiro de 2008, e a partir de 1º de Julho de 2008, a mistura do biocombustível no diesel passou a ser de 3% (B3). Foi antecipada em três anos a mistura de 5% de biodiesel ao óleo diesel no Brasil. O chamado B5, que entraria em vigor apenas em 2013, passou a ser instituído em janeiro de 2010 devido a um aumento da produção de biodiesel em âmbito nacional, suficiente para suprir as demandas.

Com essa crescente demanda por biodiesel vem aumentando a produção em âmbito nacional para suprir as exigências, agora obrigatórias, de incorporação desse biocombustível no diesel vendido comercialmente [3].

Como energia de fonte renovável, a utilização do biodiesel apresenta vantagens quando comparado a outros tipos de combustíveis, tais como gasolina e óleo diesel. Sua toxicidade é reduzida, pois é livre de enxofre e de compostos aromáticos; apresenta teores médios de oxigênio, favorecendo uma combustão mais completa; possui maior ponto de

fulgor, o que torna mais seguro seu armazenamento; sua queima libera menor quantidade de material particulado, tais como HC, CO e CO₂, diminuindo as emissões de gases do efeito estufa; é mais suscetível à biodegradação e mesmo fornecendo uma quantidade de energia 10% menor do que o diesel de petróleo, seu desempenho no motor é o mesmo [4].

A tecnologia para a produção de biodiesel predominante no mundo é a rota tecnológica de transesterificação metálica, porém muitas pesquisas mostram resultados positivos com outras metodologias como catalise ácida, heterogênea, enzimática, a produção por craqueamento, e transesterificação com metanol supercrítico [5,6,7].

Na reação de transesterificação são utilizados catalisadores que aumentam a velocidade e eficiência da reação. O álcool utilizado na reação é um álcool de cadeia curta, geralmente etanol ou metanol. Embora o etanol seja o ecologicamente correto, pois é produzido a partir da cana-de-açúcar, ou seja, de um processo de reciclagem de carbono, o metanol é mais utilizado por apresentar maior viabilidade econômica e maior rentabilidade na reação [8].

O que ocorre nessa reação é a quebra do ácido graxo em glicerol e glicerídeos. Os glicerídeos reagem com o álcool, formando os ésteres, e o glicerol é considerado um resíduo da reação [5]. Após a produção, é necessário um processo de purificação, da qual se retiram os resíduos indesejáveis da reação (glicerol, resíduo de álcool e catalisador), assim o óleo reduz sua viscosidade e apresenta um aspecto mais fluido [2]. O biodiesel somente é liberado após algumas análises, que caracterizam o combustível quanto a alguns itens, como teor de água (máximo 500 mg/kg), índice de acidez (máximo 0,50 mgKOH/g), glicerina livre e total (máximo 0,02 e 0,25 % massa, respectivamente), que devem estar de acordo com os limites impostos pelas normas previstas em lei e são indispensáveis para que

o biocombustível tenha o rendimento esperado no motor [9]. Através de um laudo analítico o biodiesel, se dentro das normas, é então liberado para o uso em 30 dias.

Na produção de biodiesel por transesterificação, além do álcool, podem variar o catalisador e o processo de purificação. Os catalisadores básicos são os mais utilizados industrialmente por apresentarem uma maior rentabilidade na reação: hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH) [4].

Muitos catalisadores e métodos de produção são alvos das mais variadas pesquisas quanto à sua influência na rentabilidade da reação e qualidade dos produtos finais. Meneghetti *et al*, por exemplo, testou em 2006, quatro tipos de catalisadores quanto ao seu rendimento por tempo de reação, e verificou que catalisadores ácidos podem competir economicamente com catalisadores básicos.

No processo de purificação do biodiesel, pelo método convencional que utiliza água para purificação, existe a possibilidade da geração de concentrações indesejáveis de água residual devido ao grau de higroscopicidade que o biodiesel possui [4]. Como método alternativo a água e bastante eficaz, temos o uso de sólidos adsorventes, como o silicato de magnésio que mostram-se promissores na purificação.

A transformação dos triglicerídeos em ésteres, presente no óleo, trouxe vantagens do ponto de vista da utilização em motores diesel: houve a diminuição no ponto de fluidez, melhorou a qualidade de ignição, e ajustou os índices de viscosidade e densidade específica [10].

A fonte de ácido graxo da reação de produção de biodiesel pode ser proveniente das mais variadas matérias primas, dentre elas citam-se as oleaginosas (soja, mamona, palma, amendoim etc.), gordura animal e óleos residuais [11]. Em 2009 o Brasil produziu cerca de

4,4 milhões m³ de biodiesel, sendo 94,7% produzido através de rota metílica. A principal matéria prima utilizada na produção foi o óleo de soja, seguida pelo sebo bovino [3].

O Brasil é um país repleto de plantas oleaginosas capazes de serem utilizadas para produção de biodiesel. Entre as plantas mais estudadas, existem muitos trabalhos sobre a utilização da mamona, de sementes de algodão, da soja, do babaçu, do girassol [8,12, 13, 14, 15] entre outras.

Embora a gordura animal, como sebo bovino provindo de frigoríficos, seja considerada um resíduo industrial e não uma fonte renovável de energia, ela acaba despertando um grande interesse dos produtores de biodiesel devido à suas características: produtividade em material graxo (100%), abastecimento sem concorrência e baixo custo de produção. O sebo é constituído por triacilglicerídeos que tem na sua composição principalmente os ácidos palmítico, esteárico e oléico [16]. O Brasil possui o segundo maior rebanho de gado bovino do mundo, produzindo anualmente 200 mil toneladas de sebo bovino. Outra grande vantagem dessa matéria prima é que ela não demanda o uso de terras cultiváveis para sua produção [17].

Por ser composto por ésteres de ácidos graxos o biodiesel possui maior degradabilidade do que o diesel, cujos constituintes são basicamente hidrocarbonetos alicíclicos, cíclicos e aromáticos, e comparativamente pode ser de mais difícil degradação no ambiente [18].

Essa maior capacidade de ser degradado é considerada uma das vantagens ao se adicionar biodiesel ao diesel em relação a contaminação ambiental, porém isso pode ser uma desvantagem quando analisado pelo ponto de vista da contaminação microbiana. Os microorganismos estão normalmente presentes no combustível, mas uma limpeza periódica

nos tanques de armazenamento, com drenagens recorrentes, acaba desacelerando seu crescimento [19].

Do ponto de vista ambiental, trata-se de uma vantagem considerando-se a possibilidade de derrames acidentais, a presença de ésteres no biodiesel conferem ao combustível diesel uma maior suscetibilidade à degradação por microorganismos do ambiente [20, 21]. Por outro lado, do ponto de vista da armazenagem, a nova formulação do combustível diesel que vem sistematicamente recebendo quantidades crescentes de biodiesel, torna o sistema mais suscetível à contaminação microbiana [20, 22]. Atualmente, o biodiesel que é misturado tem origem na soja e em sebo bovino, e dependendo da época do ano e da região as proporções podem variar.

Estudos têm demonstrado que a adição de biodiesel ao óleo diesel e a presença de água durante o armazenamento, aumentam a suscetibilidade à contaminação química e microbiana, o que pode comprometer a qualidade final do produto [21, 22]. Neste sentido, a análise de formas de produção que visem diminuir a suscetibilidade do combustível a contaminação microbiana é muito importante, pois, já é visto que essa contaminação além de afetar a qualidade do combustível acaba por danificar o motor em que é utilizado. Danos como entupimento de filtros e bicos injetores são apenas alguns resultados da utilização de combustível com contaminação microbiana elevada [19].

Desta forma, medidas físicas e químicas de controle tem sido propostas pela literatura [19, 22, 23) e por órgãos reguladores como a Agência Nacional de Combustíveis e Biocombustíveis ANP (<http://www.anp.gov.br/>). Além do cumprimento das medidas preventivas e curativas no controle da contaminação microbiana, deve ser levado em consideração a natureza do biodiesel utilizado. Dependendo do processo de produção e purificação do biodiesel, pode-se adicionar ao produto, possíveis contaminantes, como por

exemplo, a água residual e concentrações de glicerina total e livre, que mesmo dentro da especificação [24], podem acelerar processos de degradação biótica e abiótica.

2. Objetivos

2.1 Avaliar o crescimento e a degradação de um fungo deteriorogênico de biodiesel, em biodiesel de sebo bovino produzido por reações de transesterificação catalisadas por NaOH e por KOH, e submetido a um processo de purificação com água e com adsorvente sólido(magnésol)

2.2 Avaliar a produção de metabólitos ácidos, biossurfactantes e lipase durante 60 dias de incubação de um fungo deteriorogênico em meio mineral e biodiesel de sebo bovino.

3. Metodologia

3.1 Seleção preliminar dos Microrganismos:

Foram cultivados e testados durante a fase preliminar do projeto, os isolados fúngicos denominados de *Paecilomyces* sp., Fungo F e Fungo H, esses dois últimos ainda em fase de identificação. O objetivo desse primeiro cultivo foi avaliar o crescimento dos três fungos, nas condições do experimento, em uma fase aquosa e uma fase oleosa exclusiva com biodiesel de sebo. Todos os fungos utilizados no estudo foram isolados em trabalhos anteriores em nosso laboratório, de diesel e misturas com biodiesel e foram testados quanto à sua capacidade deteriorogênica [22, 25].

3.1.1 Preparação de Inóculo:

Foi adicionado à placa de petri, com cultura dos fungos descritos acima em meio BDA, água destilada estéril e 2 mL de surfactante, o Tween 80, preparado na concentração

de 0,01%, que tem por objetivo facilitar a dispersão dos esporos, uma vez que estes apresentam propriedades adstringentes.

3.1.2 Seleção preliminar dos fungos:

A avaliação do crescimento dos fungos filamentosos foi realizada nas condições descritas na seção 3.3, com o diferencial que as quantidades foram 10 mL de meio mineral e 1 mL de biodiesel em frascos de vidro de 15 mL. Previamente os fungos foram avaliados isoladamente quanto a sua capacidade em formar biomassa em frascos contendo meio mínimo mineral e apenas biodiesel como fonte de carbono por 15 dias, em estufa a 28°C. A partir desta avaliação selecionou-se visualmente o fungo que formou maior quantidade de biomassa nessas condições, que foi o *Fungo F*. Os experimentos de crescimento foram realizados em triplicata.

3.2 Combustíveis avaliados:

Como fase oleosa foi utilizado biodiesel de sebo bovino produzido no laboratório de Química Analítica, do Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os quatro tipos de biodiesel de sebo bovino (NaOH-água, NaOH-magnésol, KOH-água e KOH-magnésol) foram esterilizados utilizando um sistema com um frasco Kitassato e um filtro com membranas com porosidade de 0,22 µm (Milipore). Após a esterilização foram armazenados em frascos de vidro previamente esterilizados em autoclave e separados conforme o tipo de Biodiesel (NaOH-água, NaOH-magnésol, KOH-água e KOH-magnésol).

3.3 Condições de cultivo:

Os experimentos envolvendo o crescimento do fungo filamentoso utilizando os biodiesel de sebo como fonte de carbono e energia, foram conduzidos em frascos de vidro, previamente esterilizados, com capacidade para 200 mL, utilizando-se uma fase aquosa e uma fase oleosa. A fase aquosa foi constituída por meio mínimo mineral [26]. Em cada frasco de vidro foram adicionados 45 mL do meio mineral e esterilizados em autoclave por 15 minutos, a 121°C, a 1atm. Cada frasco foi devidamente identificado e após a esterilização, adicionou-se a fase oleosa (5 mL) nestes frascos. A fase oleosa foi constituída pelos biodiesel de sebo esterilizados, como descrito na seção 3.2. Os frascos foram recobertos com papel alumínio para evitar a foto-oxidação do combustível. O experimento foi realizado em triplicata (totalizando 144 frascos), montado com repetições destrutivas. O experimento foi avaliado durante 60 dias em intervalos de tempo de 10 dias (T10, T20, T30, T40, T50 e T60).

3.4 Curvas de crescimento do fungo filamentoso em biodiesel de sebo:

A padronização do inóculo foi realizada a partir de culturas do fungo F com 7 dias, cultivadas em BDA em tubo inclinado, mediante a adição de água destilada estéril e 2 mL de surfactante, o Tween 80, preparado na concentração de 0,01%. O uso do surfactante tem como objetivo facilitar a dispersão dos esporos, uma vez que apresentam propriedades adstringentes. Os esporos foram lavados em meio mínimo mineral, e esta solução adicionada a 10 mL de meio mineral, este, por sua vez, foi mantido em agitação a 120 rpm, a 28°C, durante 24 horas, na tentativa de esgotar possíveis reservas nutritivas presentes nos esporos dos fungos. Após 24 horas, utilizou-se 100 µl da suspensão do inóculo em cada frasco do cultivo do experimento, em que, por contagem em câmara de Neubauer, obteve-se uma concentração final com 10^4 esporos mL^{-1} .

O experimento foi incubado em estufa, a 28°C. As amostras (repetições) foram retiradas nos seguintes intervalos de tempo: 10, 20, 30, 40 dias, 50 e 60 dias.

3.4.1 Análise conduzidas:

As análises foram realizadas nos tempos estipulados aos 10°, 20°, 30°, 40°, 50° e 60° dia. Em cada tempo separou-se as fases oleosa, aquosa e a biomassa proveniente do crescimento do fungo.

A fase oleosa de cada frasco de cultivo foi transferida para um funil de separação, previamente desinfetado, utilizado para a separação de líquidos não miscíveis, ou seja, para a separação da fase aquosa e da fase oleosa. A fase oleosa destes dois ensaios foi avaliada para verificar a degradação de ésteres do tratamento B100. Na fase aquosa avaliou-se o pH, a presença de metabólitos e de substâncias surfactantes. Para a quantificação do crescimento fúngico, foi realizado inicialmente a separação da biomassa formada na interface óleo-água em sistemas de filtração. A biomassa fúngica foi quantificada através da técnica peso seco, descrito a seguir.

3.4.1.1 Quantificação da biomassa:

Antes da separação das fases aquosa e oleosa de cada frasco, a biomassa formada foi filtrada em discos de papel filtro (0,45 milipore), previamente pesados em uma balança de precisão. Para a remoção do excesso de óleo, utilizou-se 4 mL de hexano sobre cada disco. Os discos foram colocados em estufa a 50°C, durante 4 dias para remoção da umidade. Após esse período, foram transferidos diretamente para um dessecador, de onde foram retirados somente para a pesagem.

3.5 Fase aquosa:

A fase aquosa dos experimentos de curva de crescimento foi avaliada quanto à presença de substâncias emulsificantes, tensoativas e de metabólitos com características ácidas ou básicas. Estas variáveis foram analisadas durante todo o experimento, nos tempos estabelecidos de cultivo. A detecção da produção de biossurfactantes foi realizada pela medida do índice de emulsificação e pela medida da tensão superficial a partir da fase aquosa do experimento, no início e no final do ensaio da curva de crescimento.

3.5.1 Índice de emulsificação:

Para determinação do índice de emulsificação foram misturados 2 mL do meio de cultura foram misturados a 2 mL de biodiesel em um tubo de ensaio com fundo reto. A mistura foi então agitada em vortex por dois minutos e os frascos deixados em repouso por 24 horas. Após foi calculado a altura da emulsão (camada entre a fase aquosa e o hidrocarboneto) dividido pela altura total dos 4 mL e multiplicado por 100. Desta forma, é obtido o IE 24(%) (índice de emulsificação) no hidrocarboneto [27].

3.5.2 Tensão superficial:

A fase aquosa foi avaliada na ausência de biomassa. As amostras permaneceram por 30 minutos a temperatura ambiente e a medida de tensão superficial foi determinada em um medidor de tensão superficial digital (Gibertini, Milão, Itália), utilizando-se o método da placa de Wilhelmy. Para a medida foram utilizados cerca de 10 mL de fase aquosa. Para a calibração do aparelho utilizou-se como padrões líquidos a água destilada ($72,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) e etanol ($24,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

3.5.3 Detecção da produção de metabólitos ácidos:

A produção de metabólitos ácidos foi realizada através de medidas de pH, que são determinadas à temperatura ambiente com auxílio de um pHmetro digital (Digimed). As medidas de pH foram conduzidas nos tempos experimentais definidos na seção 2.4.1.

3.5.4 Detecção da produção de Lipase

A determinação da atividade de lipase foi realizada conforme metodologia proposta por Winkler, U. K; Stuckmann (1979). Utilizou-se espectrofotometria usando p-nitrofenilpalmitato (p-NPP, massa molecular = 377,5g/ Mol) como substrato para a enzima a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a produção de 1µmol de p-nitrofenol por min nas condições estabelecidas (pH 8,0 a 37°C). Inicialmente, foi montado uma curva padrão utilizando o p-nitrofenilpalmitato e obtida a seguinte equação ($[\{OD \times \text{fator da curva padrão}\} \times 10] \times 2$). As análises foram conduzidas nos tempos experimentais (T10, T20, T30, T40, T50 e T60). De posse do valor das medidas, foram calculadas as medidas de atividade.

3.6 Fase oleosa

Após a separação das fases no funil de separação, a fase oleosa foi avaliada quanto à degradação das cadeias de ésteres de ácidos graxos pela ação dos microrganismos, a partir das amostras de biodiesel (B100), utilizando a técnica de cromatografia gasosa (CG), realizada no Laboratório de Química Analítica da UFRGS. O equipamento utilizado foi uma Coluna DB-Waxetr (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), equipado com uma GC2010 da

Shimadzu. O solvente usado na análise foi o heptano Grau P.A. e o padrão interno utilizado para as medidas foi o Miristato de Etila.

Para avaliação dos ésteres totais foi utilizado a Norma ANP-EM 14103 e foram monitorados os ésteres Miristato de metila (C14:0), Palmitato de metila (C16:0), Estearato de metila (C18:0), Oleato de metila (C18:1) e Araquidato de metila (C20:0).

Para a análise do teor de glicerina total, livre e teor de mono, di e triglicerídeos foi utilizado a técnica de cromatografia a gás, de acordo com a NORMA EN 14105, realizada no Centro de Combustíveis da UFRGS - CECOM.

3.7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados referentes aos valores da biomassa, das medidas de tensão e de pH, obtidas durante as curvas de crescimento dos microrganismos, variação da área, dos picos obtidos na análise cromatográfica foi realizada com o uso do programa Statistica 7.1. Foi realizada a análise de variância e o teste de Tukey ao nível de 5% de significância, para verificar diferenças entre os diferentes tratamentos, nos tempos avaliados.

4. Resultados e Discussão

Na Figura 1 pode-se verificar o crescimento do fungo em meio mineral e os quatro tipos de biodiesel de sebo. Ao final de 60 dias de avaliação observa-se que os biodiesel KOH-Magnésol e KOH-Água favoreceram a formação de biomassa (891mg e 930mg, respectivamente) diferindo significativamente ($p < 0,05$) da biomassa formada em NaOH-Água (576mg), em que se observou o menor crescimento (Tabela 2). Schultz *et al*, em 2010, acompanhou o crescimento do Fungo F em meio mineral e encontrou resultados de

crescimento constante nos tratamentos, compatível com os resultados apresentados nesse trabalho.

Owsianiak *et al.* observou em 2009 que, em termos de fonte de energia, o biodiesel provou ser uma ótima fonte de carbono para auxiliar o crescimento microbiano, pois a conformação dos seus compostos (grupo carboxila ligado a uma cadeia alifática) possibilitaria que em apenas uma etapa enzimática hidrolítica o microrganismo obtenha ácidos graxos livres. Os dados, apresentados nesse trabalho, de crescimento do fungo utilizando o biodiesel de sebo como única fonte de carbono, indicam que o biodiesel (B100) favorece o crescimento de microrganismos, além disso, as condições de produção também podem influenciar a formação de biomassa. Neste sentido, verifica-se que em termos de armazenamento, o biodiesel produzido com o catalisador NaOH e purificado com água ou com magnesol, seriam os mais indicados para compor as misturas (BX) em circulação no país, pois como observado na Tabela 1, estes foram as amostras que apresentaram um menor crescimento fúngico ao longo dos tratamentos. No entanto, esta sugestão é referente ao biodiesel produzido a partir de gorduras animais, uma vez que a matéria prima utilizada na produção pode apresentar características diferenciadas ao final da transesterificação [20].

As medidas de tensão superficial (Tabela 1) mostraram que houve redução nos valores da fase aquosa em todos os tratamentos quando comparados com os valores padrão do Meio Mineral (55,4 mN/m) e do Etanol (22,3 mN/m). Essa redução, observada tanto nos tratamentos como nos controles, pode ter sido causada pelo próprio biodiesel de sebo, uma vez que sua composição apresenta ésteres (hidrofílicos) de ácidos graxos (hidrofóbicos), ou seja, atua como um surfactante e reduz as medidas de tensão superficial. O maior mercado

para o uso de biosurfactantes é a indústria petrolífera, onde são usados incorporados a lubrificantes, entre outros produtos [30].

Os testes de índice de emulsificação (IE 24%) não indicaram uma expressiva formação de emulsificação da fase oleosa em nenhuma dos tempos amostrados, tanto para os tratamentos controle (sem a adição de inóculo), quanto para os tratamentos em que se adicionou o inóculo do fungo F. Sendo assim, as análises de índice de emulsificação confirmaram que, nestas condições, o fungo não produziu nenhum produto emulsificante.

Durante a degradação de hidrocarbonetos há formação de ácidos orgânicos, que podem reduzir as medidas de pH da fase aquosa como verificado por Bento & Gaylarde, (2001), em que o pH baixou para 3,5 com 400 dias de estocagem. Inicialmente as medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos foram em torno de 7,2, no entanto, tais medidas indicaram que não houve uma redução deste parâmetro ao final de 60 dias (Tabela 1), observado tanto no experimento como nos frascos controle, o que não exclui a possibilidade de ocorrer uma formação de tais ácidos com maiores tempos de ensaios.

As enzimas lipolíticas, encontradas em animais, plantas e microrganismos, são responsáveis pela hidrólise dos triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol [32]. A detecção da produção de lipases pelo Fungo analisado nesse estudo, cujos valores estão expressos na Figura 2, evidencia uma produção relativamente alta, não obedecendo a uma ordem crescente nos tempos analisados, quando comparados com os valores obtidos em Schultz (2010) para esse mesmo fungo.

Fadiloglu & Erkmen (2002) observaram que o azeite de oliva, em combinação a fontes de nitrogênio, favorecia a produção de lipase por *Candida rugosa*, porém a presença de outras fontes de carbono provocava uma diminuição na atividade lipolítica.

A avaliação da degradação do biodiesel foi feita através de cromatografia gasosa (GC). As amostras eram provenientes da fase oleosa dos tempos de cultivo T0, em que o biodiesel ficou apenas armazenado no vidro esterilizado, sem contato com o microorganismo ou com o meio mineral, e o T60, em que o biodiesel esteve os 60 dias em exposição ao meio mineral, inoculado com esporos do fungo F. Foram analisadas porcentagens de degradação total, e especificamente de cinco ésteres mais abundantes na amostra, apresentados anteriormente.

Ao se comparar o percentual de degradação dos ésteres com o crescimento do Fungo F, pode-se observar que o biodiesel que apresentou o maior crescimento fúngico não obteve, no entanto, a maior porcentagem de degradação. De acordo com a Tabela 2, a degradação da fração éster do biodiesel foi praticamente nula, com destaque para o biodiesel NaOH-água, onde observou-se uma porcentagem maior de degradação dos ésteres Miristato de metila (C14:0) e Palmitato de metila (C16:0) (13% e 12%, respectivamente) e para o biodiesel KOH-água, em que foi registrado 8% de degradação do éster Estearato de metila (C18:0). Estudos anteriores também constataram baixa degradação dos ésteres por fungos, em condições similares de crescimento, apontando que outros componentes do biodiesel, como a glicerina, ou mesmo compostos mono/di/triglicerídeos podem estar sendo consumidos, e aumentando a suscetibilidade do combustível a contaminação microbiana [22]. Neste sentido, a condição experimental em que o biodiesel de sebo (KOH-água) produziu a maior biomassa após 60 dias de incubação, foi avaliada quanto ao consumo das frações de mono, di e triglicerídeos além da concentração de glicerol total e livre.

O glicerol é um subproduto gerado na reação de produção de biodiesel. É também considerado um composto fundamental no sistema metabólico de microrganismos [34], de fácil assimilação por bactérias e leveduras para a obtenção de energia metabólica, como

regulador do potencial redox e usado na reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula [35]. A quantificação do glicerol, através do método EN 14105, serve também para qualificar o processo de purificação do biodiesel, uma vez que de mais fácil degradação, uma concentração muito grande desse composto no combustível poderia facilitar o surgimento da biomassa nos tanques de armazenamento. Além disso, uma presença muito alta de glicerol no biodiesel acarreta a formação de depósitos, entupimento dos bicos injetores do motor e emissões de aldeídos, quando este é adicionado ao diesel, numa condição de estocagem [4].

O máximo previsto pela legislação brasileira é de 0,25 % de massa de glicerol presente no biodiesel de qualquer matéria prima, seja óleos vegetais ou gorduras animais, e, se observarmos a Tabela 3 mostra no T0 de tratamento uma concentração maior (0,60) do que o permitido para a liberação no mercado.

Em nosso trabalho observamos uma queda da quantidade de glicerol livre, presente na amostra, após os 60 dias de incubação (Tabela 3). Essa diminuição também foi observada no tratamento controle, o que pode relatar uma possível degradação abiótica associada ao armazenamento do combustível na presença de meio mineral.

5. Conclusões

O fungo apresentou crescimento constante durante todos os tempos experimentais, demonstrando que é capaz de utilizar biodiesel como fonte de carbono, sendo que os biodiesel em cuja produção foi utilizado como catalisador KOH apresentaram o maior crescimento dentre as amostras. A degradação da fração éster do biodiesel foi praticamente nula, concordando com estudos anteriores, em que também constataram baixa degradação dos ésteres por fungos, em condições similares de crescimento, o que indica que o fungo

pode estar consumindo outra fração do biodiesel. Os dados sobre glicerol mostram uma queda na concentração desse na amostra após os 60 dias de incubação do experimento, porém isso também é observado no tratamento controle, o que sugere uma degradação abiótica ocorrendo associada ao armazenamento do biodiesel na presença de meio mineral.

As medidas de tensão superficial obtidas nos tratamentos em que se inoculou o fungo não são indicativas de produção de biosurfactante, pois essa diminuição também foi observada nos tratamentos controle. As análises de índice de emulsificação confirmaram que, nestas condições, o fungo não produziu nenhum produto emulsificante. As medidas de pH não se alteraram ao longo do experimento. A produção de lipases foi relativamente alta, porém não obedecendo a um padrão constante de produção.

6. Agradecimentos

Ao CNPq pelas bolsas concedidas e ao Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5. Referências bibliográficas

- [1] Rocha, M. T. Tese de Doutorado. ESALQ, Piracicaba, **2003**.
- [2] Cartilha Sebrae - Biodiesel. 2007. <<http://www.biblioteca.sebrae.com.br>>. Acesso em agosto de **2010**.
- [3] Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis **2010**. Ministério de Minas e Energia. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, BRASIL. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/conheca/anuario_2010.asp>. Acesso em setembro de 2010.
- [4] Lôbo, I. P., Ferreira, S.L.C., Cruz, R. S. Quím. Nova **2009**, Vol. 32, No. 6.
- [5] Macedo, G. A., Macedo, J. A., Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento nº 32, **2004**.
- [6] Demirbas, A. Energy Conversion and Management **2007**, 48, 937.
- [7] Krause, L.C., Tese de doutorado Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2008**, 130p.
- [8] Meneghetti, S. M. P.; Meneghetti, M. R.; Wolf, C. R.; Silva, E. C.; Lima, G. E. S.; Silva, L. L.; Serra, T. M.; Cauduro, F.; de Oliveira, L. G., (2006a). Energy & Fuels **2006**, 20, 2262.
- [9] <http://www.bsbios.com/>. Acessado em novembro de 2010
- [10] Ramos, L.P., Kucek, K., Domingos, A.K., Wilhem, H.M. Ciência e Desenvolvimento **2003**, 31, 28.
- [11] Knothe, G.; Gerpen, J. V.; Krahl, J.; Ramos, L. P.; Manual de Biodiesel, Ed. Edgard Blucher: São Paulo, **2006**.
- [12] Ferrari, R. A.; Oliveira, V. S.; Scabio, A.; Química Nova. **2005**, 28, p.19.
- [13] Rashid U, Anwar F, Knothe G.; Fuel Processing Technology **2009**; 90:1157.

- [14] Lima, J. R. O.; Silva, R. B.; Silva, C. C. M.; Santos, L. S. S.; Santos Jr., J.R.; Moura, E. M.; Moura, C. V. R.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 600.
- [15] Ferrari, R. A.; Oliveira, V. S.; Scabio, A.; *Quim. Nova* **2009**, 32, 106.
- [16] Moura, K. R. M.; Silva, F. C.; Brandão, K. S. R.; Souza, A. G.; Conceição, M. M. I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. Artigos técnico-científicos, **2006**.
- [17] Paiva, T.M.N., Peres, S. Resumo publicado nos Anais do III Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, **2009**.
- [18] Mariano AP, Tomasella RC, Oliveira LM, Contiero J, Angelis DF. *Afr J Biotechnol* **2008**, 7:1323.
- [19] Gaylarde, C.C.; Bento, F.M.; Kelley, J. *Revista de Microbiologia*, **1999**, 30, p. 1.
- [20] Passmann, F.; Dobranick, J.K. In: International Conference on Stability, Handling and use of liquid fuels, Espanha, **2005**, p.18-22.
- [21] Bento, F., Viscardi. L.C.; Daroda, R. Menezes, A.G.; Gaylarde, C.C.; Camargo, F. A. O. *Revista BIODIESEL* **2006**, N ° 4, p:24.
- [22] Bücker, 2009. Dissertação de Mestrado, UFRGS, Porto Alegre, Brasil, **2009**.
- [23] Vieira, T. M. et al. In: Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel **2006**, Brasília. Artigos técnico-científico, Brasília: Estação Gráfica, v.1. p. 218.
- [24] <http://nxt.anp.gov.br/> ANP 2008. Resolução ANP nº 7, acessado em 16/11/2010.
- [25] Schultz, **2010**. Dissertação de Mestrado, UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 2010.
- [26] Richard, J.Y.; Vogel, T.M. *International Biodeterioration & Biodegradation* **1999**, v.44, n.2-3, p.93.

- [27] Bento, F.M.; Camargo, F.A.O., Gaylarde, C.C. Em Melo, I.S.; Azevedo, J.L. *Microbiologia Ambiental. Biossurfactantes*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, **2008**, Cap 7, p.151.
- [28] Winkler, U. K; Stuckmann, M.(**1979**), *Journal of Bacteriology*, v. 138, p. 663-670.
- [29] Owsianiak M, Chrzanowski L, Szulc A, Staniewski J, Olszanowski A, Olejnik-Schmidt AK, and Heipieper HJ. *Bioresource technology* **2009**, v100, n3: 1497.
- [30] Bento, F. M., Gaylarde, C. C. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2001**, v.47, n.2, p.107.
- [31] Nitschke, Márcia and Pastore, Gláucia Maria. *Biossurfactantes: propriedades e aplicações*. *Quím. Nova* **2002**, vol.25, n.5, p 772.
- [32] Gonçalves, F.A.G. *Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos*, Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte. **2007**. 66p.
- [33] Fadiloglu, S. and O. Erkmén. *Turkish J. Engine. Enviromental Sciences* **2002**, 26, 249.
- [34] Costa, **2010**. *Dissertação de Mestrado*, UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 2010.
- [35] Rivaldi, J.D.; Sarroub, B.F.; Fiorilo, R.; Silva, S.S. da. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento* **2008**, Vol. 10 (37) p. 44.

Lista de legendas

Figuras

Figura 1. Curva de crescimento do fungo filamentoso em meio mineral e quatro tipos de biodiesel de sebo durante 60 dias, a 28°C. (◆) KOH- Água, (■)KOH-Magnesol, (▲)NaOH-Magnesol, (◇) NaOH- Água.

Figura 2. Atividade da Lipase observada nos tempos analisados (u/ml).

Tabelas

Tabela 1. Medidas de tensão superficial, pH e de valores de biomassa do fungo F em meio mineral e biodiesel de sebo (B100) purificado e seus respectivos controles (sem inóculo), após 60 dias.

Tabela 2. Percentagem de degradação de ésteres, para cada condição utilizada após 60 dias de incubação do fungo F em meio mineral e biodiesel de sebo .

Tabela 3. Percentual de degradação dos ésteres avaliados e concentração de glicerol total, livre e mono, di e tri glicerídeos da condição experimental KOH-água após 60 dias de incubação.

Lista de Figuras

Figura 1

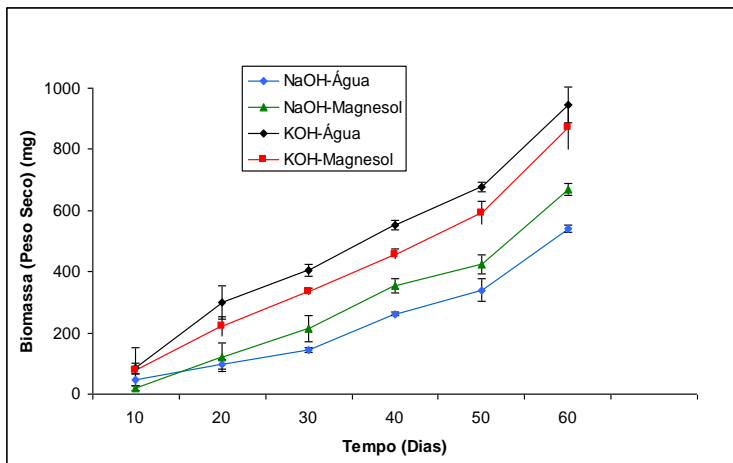
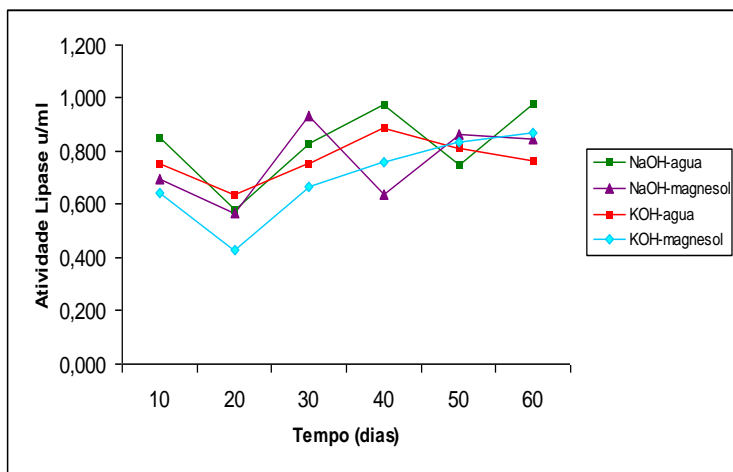


Figura 2



Lista de Tabelas

Tabela 1

<i>Biodiesel de Sebo</i>		<i>Tensão Superficial</i> (mN.m ⁻¹)	<i>pH</i>	<i>Biomassa</i>
<i>NaOH-Água</i>	Tratamento	31,7 ± 2,71	6,88	576 mg ^a
	Controle	30,3 ± 3,1	6,81	
<i>NaOH-Magnesol</i>	Tratamento	30,13 ± 1,61	6,87	773 mg ^{ac}
	Controle	28,7 ± 4,1	6,93	
<i>KOH-Água</i>	Tratamento	29,8 ± 1,47	6,87	930 mg ^b
	Controle	29,9 ± 1,68	6,84	
<i>KOH-Magnesol</i>	Tratamento	29,26 ± 1,06	6,89	891 mg ^{bc}
	Controle	30,5 ± 2,43	6,86	

Letras iguais junto às médias indicam valores significativamente semelhantes entre si.

Tabela 2

	Ésteres / % de Degradação	KOH Magnesol	KOH Água	NaOH Magnesol	NaOH Água
1	Miristato de metila	0,000	0,000	0,000	13,403
2	Palmitato de metila	0,000	0,048	2,455	12,968
3	Estearato de metila	1,702	8,161	3,194	4,257
4	Oleato de metila	0,000	0,000	2,086	1,519
5	Araquidato de metila	0,000	0,000	0,499	0,0

Tabela 3

		Tempo 0	Tempo 60 Controle	Tempo 60 Fungo	Especificação EN 14105
1	Miristato de metila	-	0,000	0,000	-
2	Palmitato de metila	-	0,024	0,048	-
3	Estearato de metila	-	4,080	8,161	-
4	Oleato de metila	-	0,000	0,000	-
5	Araquidato de metila	-	0,000	0,000	-
	Glicerol total	0,605	0,435	0,460	Máx 0,25
	Glicerol livre	0,005	0,000	0,000	Máx 0,02
	Monoglicerol	0,505	0,110	0,090	Anotar
	Diglicerol	0,475	0,540	0,575	Anotar
	Triglicerol	3,905	3,175	3,410	Anotar

Publicação pretendida na Revista Química Nova

NORMAS DE PUBLICAÇÃO 2010

GERAL - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Artigos de Revisão (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

Artigos sobre Educação (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Notas Técnicas (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line de QN*. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*).. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de *QN* junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

Referências

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma

determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771* **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004* **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI 9.604.468-3*, **1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

SUBMISSÃO DOS ARTIGOS – A *QN* oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo *.pdf*, a partir de arquivo *.doc* ou *.rtf*, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Material Suplementar – Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

MANUSCRITOS REVISADOS – Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias ou serão considerados retirados,

sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento *.pdf* completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de *QN*.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

VERSÃO FINAL – Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato *.pdf* não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão *tif* ou *jpg*, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão *tif/jpg*, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: *cdr*, *eps*, *cdx* ou *opj*. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

A Editoria de *QN* reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.