



ARTIGO

## Suscetibilidade do biodiesel de sebo bovino à biodegradação por *Pseudallescheria boydii*

Juciana Clarice Cazarolli<sup>1\*</sup>, Francielle Bucker<sup>1</sup>, Márcia Cardoso Manique<sup>2</sup>, Laiza Canielas Krause<sup>3</sup>, Gabriela Pereira da Silva Maciel<sup>4</sup>, Bruna Onorevoli<sup>4</sup>, Elina Bastos Caramão<sup>4</sup>, Eduardo H. S. Cavalcanti<sup>5</sup>, Dimitrios Samios<sup>4</sup>, Maria do Carmo Ruaro Peralba<sup>4</sup> e Fátima Menezes Bento<sup>1</sup>

Recebido: 06 de setembro de 2011    Recebido após revisão: 18 de maio de 2012    Aceito: 23 de julho de 2012  
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2026>

**RESUMO:** (Susceptibilidade do biodiesel de sebo bovino à biodegradação por *Pseudallescheria boydii*). As características do biodiesel produzido podem afetar a sua suscetibilidade à biodegradação por ação microbiana, o que tem sido uma preocupação freqüente, pois leva a mudanças nas propriedades de combustível durante o armazenamento. O objetivo do presente trabalho foi comparar o crescimento microbiano em biodiesel de sebo bovino, catalisado com NaOH ou KOH e purificado com água ou com o adsorvente sólido silicato de magnésio. O experimento foi realizado em frascos de vidro com capacidade para 200 mL, constituído de 45 mL de meio mínimo mineral e 5 mL de cada tipo de biodiesel (4 tratamentos), e foram adicionados  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup> do fungo filamentososo *Pseudallescheria boydii*. As análises foram realizadas durante 60 dias, a cada 10 dias avaliou-se: formação de biomassa do fungo (peso seco); produção de metabólitos oriundos do crescimento do fungo (pH); e, na fase oleosa, a variação no teor de ésteres totais e de glicerina total. Ao final dos 60 dias, pode-se observar menor formação de biomassa no biodiesel NaOH-Água (576 mg), seguido pelo biodiesel NaOH-Magnesol (773 mg). Os biodieseis KOH-Magnesol e KOH-Água favoreceram a formação de biomassa (891 mg e 930 mg, respectivamente).

**Palavras-chave:** biocombustível, gordura animal, armazenamento, biodegradação.

**ABSTRACT:** (Susceptibility of biodiesel from tallow to biodegradation by *Pseudallescheria boydii*). The characteristics of biodiesel produced can affect its susceptibility to biodegradation by microbial action, which has been of frequent concern since it leads to changes of fuel properties during storage. The goal of the present work was to compare the microbial growth in biodiesel obtained from tallow catalyzed by NaOH or KOH and purified with water or the solid adsorbent magnesium silicate. The experiment was carried out in 200 mL glass bottles containing 45 mL of mineral medium and 5 mL of each type of biodiesel (4 treatments) and  $10^4$  spores.mL<sup>-1</sup> of the filamentous fungi *Pseudallescheria boydii*. The analyses were carried out during 60 days and after each 10 days it was evaluated: fungi biomass formation (dry weight); production of metabolites originated from the fungi growth (pH); variation in the amount of total esters and total glycerol in the oily phase. After 60 days it was possible to observe lower biomass formation in the biodiesel NaOH-water (576 mg) followed by biodiesel NaOH-magnesol (773 mg). The biodiesel KOH-magnesol and KOH-water favored the biomass formation (891 mg and 930 mg respectively).

**Key words:** biofuels, animal fat, storage, biodegradation.

### INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma ampla definição do biodiesel (também denominado de biocombustível), visto que a matéria-prima para sua produção pode ter diferentes origens. As matérias-primas podem ser óleos vegetais, bem como gorduras animais, tais como sebo de boi, de aves, etc. 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. Inicialmente, a proporção de biodiesel adicionada ao diesel era de 2%, denominado de B2, sendo obrigatório seu uso a partir de janeiro de 2008. A partir de 1º de Julho de 2008, a mistura do biodiesel no diesel passou a

ser de 3% (B3) e a mistura B5 (5% de adição), que entraria em vigor apenas em 2013, passou a ser instituída em janeiro de 2010 (Resolução CNPE Nº 6; ANP 2009).

A tecnologia para a produção de biodiesel predominante no mundo é a rota tecnológica de transesterificação metílica, que consiste na reação de um ácido graxo com um álcool, geralmente de cadeia curta, comumente etanol ou metanol. O metanol é o mais utilizado por apresentar maior viabilidade econômica e maior rentabilidade na reação (Teixeira *et al.* 2010). Nesta reação são utilizados catalisadores que aumentam a sua velocidade e eficiência. Há vários catalisadores que podem ser utilizados: a catálise alcalina geralmente é mais utiliza-

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

2. 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, Porto Alegre, RS Brasil.

3. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial – PPGBI, Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP. Av. Murilo Dantas 300, Bairro Farolândia, CEP 49032-490, Aracaju, SE, Brasil.

4. Departamento de Química Inorgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Campus do Vale, Bairro Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS Brasil.

5. Instituto Nacional de Tecnologia - Divisão de Corrosão e Degradação. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

\* Autor para contato. E-mail: jucianacazarolli@gmail.com

da por ser mais rápida que a ácida, porém a sua utilização depende da natureza dos óleos utilizados na reação (Macedo & Macedo 2004). Os catalisadores hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH), utilizados na produção do biodiesel testado neste trabalho, costumam promover rendimentos satisfatórios em transesterificações (Lôbo *et al.* 2009).

Após a produção é necessário um processo de purificação, no qual se retiram os resíduos indesejáveis da reação (glicerol, resíduo de álcool e catalisador), produzindo um óleo de menor viscosidade e de aspecto mais fluido. No método convencional do processo de purificação do biodiesel, o qual utiliza água, existe a possibilidade da geração de concentrações indesejáveis de água residual devido ao grau de higroscopicidade do biodiesel (Lôbo *et al.* 2009). Um método alternativo à utilização de água, e bastante eficaz, é o uso de sólidos adsorventes, como o silicato de magnésio, que têm se mostrado promissores na purificação.

O biodiesel somente é liberado para o mercado após a realização de algumas análises especificadas pela Agência Nacional de Petróleo (Resolução N° 7, ANP 2008). Caso o biodiesel não venha a ser comercializado no prazo de 30 dias após a emissão do Certificado de Qualidade pelo fabricante, o mesmo deverá ter refeitas suas análises. Dentre as análises exigidas estão: a massa específica a 20 °C, teor de água, índice de acidez e de estabilidade à oxidação a 110 °C. Se a diferença de massa específica a 20 °C for superior a 3,0 kg/cm<sup>3</sup>, deverá ser realizada a recertificação completa do produto. Os valores de cada análise 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 (Cavalcanti 2009).

A fonte de ácido graxo da reação de transesterificação pode ser proveniente das mais variadas matérias primas, dentre elas citam-se as oleaginosas, como soja, mamona, palma e amendoim, gordura animal e óleos residuais (Knothe *et al.* 2006). Embora a gordura animal, como o 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 de 100% de produtividade em material graxo e baixo custo de produção.

Por ser composto por ésteres de ácidos graxos, o biodiesel possui maior degradabilidade do que o diesel, cujos constituintes são basicamente hidrocarbonetos de cadeias longas, e comparativamente pode ser de mais difícil degradação no ambiente (Mariano *et al.* 2008). Essa propriedade 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 armazenagem, visto que os microrganismos estão normalmente presentes no combustível.

A participação de microrganismos como um dos agentes na deterioração de combustíveis vem sendo

relatada na literatura desde 1895, quando Myosche observou o crescimento do fungo *Botrytis cinerea* em parafina (Bento & Gaylarde 2001). Atualmente vários estudos evidenciam o potencial deteriorogênico de vários microrganismos, como *Candida viswanathii* (Oliveira 2008), *Hormoconis resinae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, *Candida silvicola* (Bento & Gaylarde 2001), *Pseudallescheria boydii* (Janda Ulfi *et al.* 1999), bactérias redutoras de sulfato (BRS) e bactérias desnitrificantes (BDN) (Gaylarde *et al.* 1999). Procedimentos como drenagens freqüentes e limpeza nos tanques de armazenamento podem ser uma forma preventiva de controlar o crescimento microbiano (Gaylarde *et al.* 1999). Com a introdução de biodiesel, tem-se verificado uma maior suscetibilidade da nova mistura (diesel/biodiesel) à biodeterioração e à instabilidade química, o que leva a um aumento na geração de sedimentos de natureza biológica e/ou química (Mariano *et al.* 2008; Bento *et al.* 2006; Bucker *et al.* 2011; Siegert 2009), comprometendo a qualidade final do produto armazenado (Bento *et al.* 2006, Bucker *et al.* 2010).

Além do cumprimento das medidas preventivas e curativas no controle da contaminação microbiana, deve ser levada em consideração a natureza do biodiesel utilizado, visto que distintos subprodutos de reação certamente são formados. Somado a estes fatores, dependendo do processo de produção e purificação do biodiesel, pode ser adicionado ao produto possíveis contaminantes, por exemplo, água residual e concentrações de glicerina total e livre, entre outros, que mesmo dentro da especificação (Resolução N° 7; ANP 2008) podem acelerar processos de degradação biótica e abiótica.

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o crescimento e a degradação de um fungo deteriorogênico de biodiesel, em biodiesel de sebo bovino produzido por reação de transesterificação metálica, catalisada por NaOH ou por KOH, e submetido a dois processos de purificação, com água e com adsorvente sólido, silicato de magnésio.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material Utilizado*

Como fase oleosa do experimento, foi utilizado biodiesel de sebo bovino produzido pelo Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por transesterificação metálica, com os catalisadores NaOH ou KOH, e purificados por água ou silicato de magnésio (magnésol). Os quatro tipos de biodiesel de sebo bovino, separados de acordo com o catalisador e a sua forma de purificação (NaOH-água, NaOH-magnésol, KOH-água e KOH-magnésol) passaram por esterilização utilizando sistema sob vácuo, com um frasco Kitassato e filtro de acetato de celulose (0,22 µm da Millipore). Após, os biodieseis foram armazenados, individualmente, em frascos de vidro previamente esteri-

lizados em autoclave.

O fungo utilizado no estudo, oriundo do Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis (LAB-BIO, ICBS-UFRGS), foi isolado de borra biológica proveniente de tanques de armazenamento de combustíveis, cultivado em placas de Petri com meio Batata-dextrose-Ágar (BDA-MERCK) e identificado por técnicas moleculares como sendo *Pseudallescheria boydii*, através de amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 pelos *primers* ITS-1 e ITS-4, sendo os fragmentos submetidos a sequenciamento automático no sistema MegaBACE 1000.

#### *Equipamentos utilizados para as análises*

A detecção dos metabólitos ácidos foi feita através da determinação do pH, utilizando um pHmetro digital da Digimed, modelo DM-22. Para análise da tensão superficial foi utilizado um medidor de tensão superficial digital (Gibertini Digital Tensiometer, Milão, Itália). Para a pesagem (reagentes e discos de papel filtro) foi utilizado uma balança eletrônica de precisão (Marte, modelo AL200C). O equipamento utilizado para análises da fase oleosa foi um cromatógrafo a gás da Shimadzu, modelo GC2010, equipado com uma Coluna DB-Waxetr (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), injetor *split/splitless* e detector de ionização em chama (FID), segundo a NORMA ANP-EM 14103.

Para a análise do teor de glicerina total, livre e teor de mono, di e triacilglicerídeos foi utilizado o mesmo cromatógrafo acima citado, porém equipado com coluna HT5 (25 m x 0,32 mm x 0,10  $\mu$ m) da SGE, injetor PTV e detector FID, de acordo com a NORMA EN 14105.

#### *Preparação do Inóculo*

A padronização do inóculo foi realizada a partir de culturas de *Pseudallescheria boydii* com sete dias, cultivadas em BDA em tubo inclinado, mediante a adição de 8 mL de água destilada estéril e 2 mL do surfactante Tween 80, preparado na concentração de 0,01% w/w, cujo uso tem por objetivo facilitar a dispersão dos esporos, uma vez que esses apresentam propriedades adstringentes. A solução obtida foi adicionada a 10 mL de meio mineral, e mantida em agitação a 120 rpm, a 28 °C, por 24 horas, na tentativa de esgotar possíveis reservas nutritivas presentes nos esporos do fungo. A concentração final do inóculo foi de  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>, determinada por contagem em Câmara de Neubauer.

#### *Crescimento do fungo Pseudallescheria boydii em Biodiesel de Sebo Bovino*

Foram conduzidos em frascos de vidro, com capacidade para 200 mL, utilizando-se uma fase aquosa constituída por meio mínimo mineral (Richard & Vogel 1999) e uma fase oleosa (biodiesel de sebo).

Em cada frasco de vidro foram adicionados 45 mL do meio mineral e esterilizados em autoclave por 15 minutos, a 121 °C, a 1 atm. Cada frasco foi devidamente

identificado e após a esterilização, adicionou-se a fase oleosa (5 mL) e posteriormente 100  $\mu$ L do inóculo, com concentração de  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Os frascos foram recobertos com papel alumínio de modo a evitar a foto-oxidação do combustível.

O experimento foi realizado em triplicata, obtendo assim, para cada amostra de biodiesel, quatro frascos, com seus respectivos controles, montado com repetições destrutivas, e avaliado durante 60 dias em intervalos de tempo de 10 dias (T10, T20, T30, T40, T50 e T60), totalizando 144 frascos.

#### *Quantificação da Biomassa*

Para cada tempo de análise separou-se as fases oleosa e aquosa, bem como a biomassa proveniente do crescimento do fungo. A fase oleosa de cada frasco de cultivo foi transferida para um funil de separação, previamente desinfetado com álcool 70%, para a separação das fases aquosa e oleosa. Para a quantificação do crescimento fúngico, foi realizado inicialmente a separação da biomassa formada na interface óleo-água por sistemas de filtração. A biomassa fúngica foi quantificada através da técnica de peso seco, que consiste em realizar a separação das fases aquosa e oleosa de cada frasco em um funil de separação. Inicialmente, para a remoção do excesso de óleo, a biomassa foi lavada com 4 mL de hexano e filtrada sob vácuo, em discos de papel filtro comum, previamente pesados em uma balança de precisão. Após, os discos foram colocados para secar em estufa a 50 °C, durante quatro dias. Após esse período, foram transferidos para um dessecador, onde permaneceram até o momento da pesagem.

#### *Análises da Fase Aquosa após o Crescimento Fúngico*

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 biosurfactantes foi realizada pelas medidas do índice de emulsificação e da tensão superficial. As medidas foram realizadas em todos os tempos do experimento, de modo a identificar a partir de qual tempo poderia haver a formação de emulsão e ou redução da medida da tensão superficial. Após a separação da fase oleosa e biomassa, a fase aquosa permaneceu por 30 minutos a temperatura ambiente. Foi utilizado o medidor de tensão superficial (marca Gibertini, Itália) com o método da placa de Wilhelmy. Para o procedimento, foram utilizados cerca de 10 mL de fase aquosa e para a calibração do aparelho, utilizou-se como padrões líquidos a água destilada (72,0 mN.m<sup>-1</sup>) e o etanol (22,8 mN.m<sup>-1</sup>) (Freireira 2004), segundo Bento *et al.* (2008).

A detecção dos metabólitos ácidos foi feita através do monitoramento do pH durante todos os tempos analisados. Para determinação do índice de emulsificação



foram misturados 2 mL do meio de cultura 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 (Bücker *et al.* 2010). 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 e expresso o IE 24(%) (índice de emulsificação) do hidrocarboneto.

#### Análises da Fase Oleosa após Crescimento Fúngico

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, nas amostras de biodiesel (B100), utilizando a técnica de cromatografia a gás (CG/FID). As condições de análise foram:  $T_{\text{injetor}} = T_{\text{detector}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$ , forno com  $T_{\text{inicial}} = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 2 min, seguido de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantido em isoterma por 3 min e taxa de aquecimento de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantidos por 2 min. A quantidade de amostra injetada foi de  $1\text{ }\mu\text{l}$  no modo Split (1:50), e o gás de arraste  $\text{H}_2$ . A técnica de quantificação foi a de padronização interna, usando como padrão interno (PI) o Miristato de Etila. Tanto as amostras, como o padrão utilizado, foram dissolvidos em heptano grau P.A. (Tedia Brazil).

Na análise, foram determinados 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 também utilizada a técnica de cromatografia a gás. Foi utilizada uma coluna HT5 (25 m x 0,32 mm x 0,10  $\mu\text{m}$ ) da SGE, injetor PTV *on column* e detector FID, de acordo com a NORMA EN 14105. As condições de análise foram:  $T_{\text{injetor}} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um minuto, seguido de aquecimento de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $380\text{ }^{\circ}\text{C}$ , permanecendo isotermicamente por 20 min;  $T_{\text{inicial}}$  do forno de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um minuto,  $15\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $7\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $370\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantidos em T isotérmica por 12 min.  $T_{\text{detector}} = 390\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o uso do programa Statística 7.1. Foram realizados testes

para 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. Os dados avaliados foram os valores da biomassa, de pH e de tensão superficial, obtidos durante as curvas de crescimento do fungo *Pseudallescheria boydii*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento do fungo *P.boydii* pode ser visualizado na Figura 1. Ao final de 60 dias de avaliação, observou-se que os biodieseis KOH-Magnesol e KOH-Água apresentaram a maior quantidade de biomassa, 891 mg e 930 mg, respectivamente, diferindo significativamente ( $p < 0,001$ ) da biomassa formada pelo biodiesel NaOH-Água (576 mg), no qual foi observado o menor crescimento (Tab. 1). Schultz (2010) acompanhou o crescimento do fungo *Pseudallescheria boydii* em meio mineral e biodiesel, cujos resultados apresentaram comportamento similar do presente trabalho.

Paralelamente, foi observado que as condições de produção também podem influenciar a formação de biomassa. Segundo os dados da Tabela 1, os biodieseis produzidos de sebo com o catalisador NaOH e purificado com água ou com magnesol, seriam os mais indicados para compor as misturas diesel/biodiesel (BX) em circulação no país, uma vez que essas foram as amostras que apresentaram um menor crescimento fúngico ao longo dos tratamentos. Cabe lembrar e evidenciar que 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 (Lôbo *et al.* 2009), e que a presença de pequenas quantidades de água (microlitros) é suficiente para dar início ao desenvolvimento microbiano.

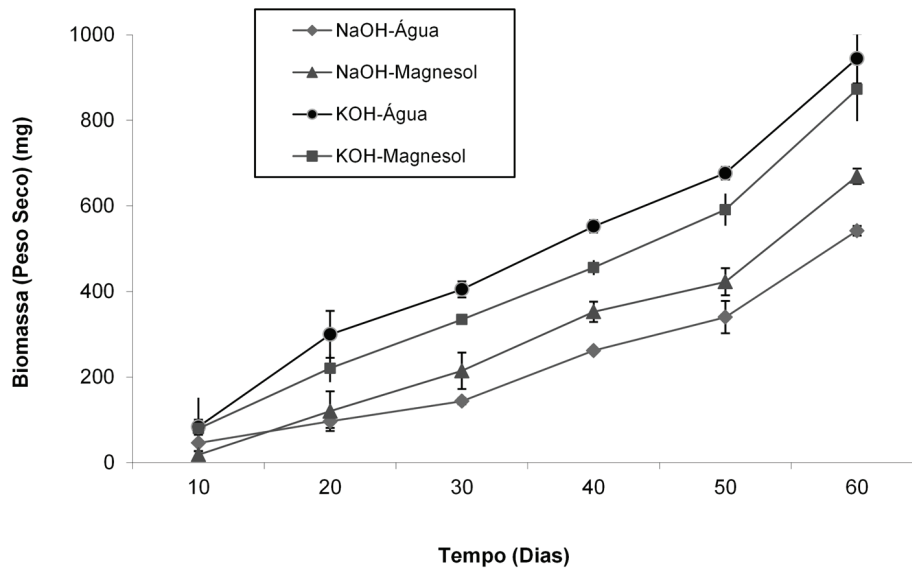
Owsianiak *et al.* (2009) observaram, através de curvas de crescimento com um inóculo proveniente de borra biológica, que os ésteres de ácidos graxos provaram ser uma ótima fonte de carbono no auxílio do crescimento microbiano, em termos de necessidade energética. Os dados apresentados nesse trabalho de crescimento do fungo utilizando o biodiesel de sebo como única fonte de carbono indicaram que o biodiesel puro de sebo bovino (B100) beneficiou o crescimento deste microrganismo.

Quanto às medidas de tensão superficial (Tab. 1),

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

| Biodiesel de Sebo Bovino |            | Tensão Superficial (mN.m <sup>-1</sup> ) | pH  | Biomassa (mg) |
|--------------------------|------------|--|-----|---------------|
| NaOH-Água                | Tratamento | 31,7 ± 2,7                               | 6,9 | 576 c*        |
|                          | Controle   | 30,3 ± 3,1                               | 6,8 |               |
| NaOH-Magnesol            | Tratamento | 30,1 ± 1,6                               | 6,9 | 773 bc        |
|                          | Controle   | 28,7 ± 4,1                               | 6,9 |               |
| KOH-Água                 | Tratamento | 29,8 ± 1,4                               | 6,9 | 930 a         |
|                          | Controle   | 29,9 ± 1,6                               | 6,8 |               |
| KOH-Magnesol             | Tratamento | 29,2 ± 1,1                               | 6,9 | 891 ab        |
|                          | Controle   | 30,5 ± 2,4                               | 6,9 |               |

\* Letras iguais junto às médias indicam valores significativamente semelhantes entre si ( $p < 0,001$ ).



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

verificaram-se que houve redução nos valores de tensão superficial da fase aquosa quando comparados com os valores padrão do Meio Mineral utilizado no tempo inicial do experimento ( $55,4 \text{ mN.m}^{-1}$ ) ( $p < 0,001$ ), em todos os tipos de biodiesel. Essa redução, observada tanto nos tratamentos com o fungo como nos controles ( $p > 0,001$ ), pode ter sido causada pelo próprio biodiesel de sebo, uma vez que sua composição apresenta ésteres saponificados (hidrofílicos) de ácidos graxos (hidrofóbicos), que podem atuar como surfactantes, reduzindo as medidas de tensão superficial. O mesmo comportamento não foi obtido para os testes de índice de emulsificação (IE 24%), já que não houve indicativo de uma expressiva formação de emulsificação da fase oleosa em nenhum 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. 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, em um sistema de estocagem, real ou simulado, de armazenamento de combustível (Bento & Gaylarde 2001). Segundo Bento & Gaylarde (2001), foi observado uma diminuição do pH da fase aquosa de 7,3 para 3,5 em 400 dias de estocagem simu-

lada, com um consórcio microbiano em meio mineral e diesel metropolitano. Também foi verificado em outro estudo (Bento *et al.* 2005) que o microrganismo *Aspergillus fumigatus*, considerado um fungo deteriorante de óleo diesel, após 60 dias de crescimento em meio mineral Bushnell-Haas e óleo diesel, reduziu o valor de pH da fase aquosa de 7,2 para 4,8. A análise cromatográfica por microextração em fase sólida (SPME) dessa fase aquosa revelou a presença de ácido propiônico e uma série de álcoois e cetonas, justificando o decréscimo nos valores de pH. França *et al.* (2011) comparou a degradação de ésteres de biodiesel de soja em diferentes concentrações (10, 20 e 30%) com valores de pH 4, 5 e 7 e verificou que este parâmetro não influencia na atividade de degradação pelos microrganismos testados no estudo, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pichia guilliermondii*, sendo a influência proveniente das diferentes concentrações do biocombustível. No presente trabalho, as medidas de pH iniciais da fase aquosa foram em torno de 7,2, não havendo uma redução deste parâmetro ao final de 60 dias ( $p > 0,001$ ) (Tab. 1), observado tanto no experimento como nos frascos controle. Porém, tal fato não exclui a possibilidade de ocorrer uma formação desses ácidos com tempos maiores de ensaio, principalmente pelo fato do meio mínimo mineral apresentar uma concentração de  $3,39 \text{ g L}^{-1}$  de fosfatos, cujo poder tampão pode mascarar a produção de metabólitos

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

| Ésteres / % de Degradação | KOH Magnesol | KOH Água | NaOH Magnesol | NaOH Água |
|---------------------------|--------------|----------|---------------|-----------|
| Miristato de metila       | 0,0          | 0,0      | 0,0           | 13,4      |
| Palmitato de metila       | 0,0          | 0,0      | 2,5           | 13,0      |
| Estearato de metila       | 1,7          | 8,2      | 3,2           | 4,3       |
| Oleato de metila          | 0,0          | 0,0      | 2,1           | 1,5       |
| Araquidato de metila      | 0,0          | 0,0      | 0,5           | 0,0       |

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

|                | Tempo 0 | Tempo 60<br>Controle | Tempo 60<br>Fungo | Especificação<br>da EN 14105 |
|----------------|---------|----------------------|-------------------|------------------------------|
| 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                       |

ácidos (Bento *et al.* 2005).

Óleos de diferentes matérias primas apresentam composição de ácidos graxos também diferentes e por meio do processo de produção de biodiesel podem caracterizar o combustível com maiores quantidades de uma ou outra molécula. O biodiesel de sebo, em particular, é rico nos ácidos graxos oleico, palmítico e esteárico (Moura *et al.* 2006; Pinto *et al.* 2005).

Ao comparar o percentual de degradação dos ésteres com a formação de biomassa pelo fungo *P. boydii* (Fig. 1 e Tab. 2), observa-se que o biodiesel que apresentou o maior crescimento fúngico não obteve, no entanto, a maior porcentagem de degradação de ésteres (KOH-água). De acordo com a Tabela 2, a degradação da fração éster do biodiesel foi baixa em quase todos os tratamentos. As exceções foram para os biodieseis NaOH-água, onde observou-se uma porcentagem maior de degradação dos ésteres Miristato de metila (C14:0 – 13%) e Palmitato de metila (C16:0 – 12%), e do 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 os compostos mono, di ou triacilglicerídeos podem estar sendo consumidos, aumentando a suscetibilidade do combustível à contaminação microbiana (Bücker *et al.* 2010, Schultz 2010). Neste sentido, a condição experimental em que o biodiesel de sebo produziu a maior biomassa após 60 dias de incubação (KOH-água) foi avaliada quanto ao consumo das frações de mono, di e triacilglicerídeos além da concentração de glicerol total e livre (Tab. 3).

Segundo a Tabela 3, há uma queda da quantidade de glicerol livre, presente na amostra, após os 60 dias de incubação. Essa redução também foi observada no tratamento controle, o que pode estar relacionado com processos de degradação abiótica, devido ao contato com a fase aquosa (meio mineral). Neste sentido, pode-se inferir que a quantidade de glicerol residual no biodiesel de sebo não influenciou a formação de biomassa, ou seja, não foi a única fonte de carbono utilizada pelo fungo no processo de crescimento.

Na Tabela 3 observa-se que no tempo zero (T0) de tratamento, há uma concentração maior de glicerol (0,60% massa) do que o permitido para a liberação no mercado. 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 de gorduras animais.

## CONCLUSÕES

A cultura de fungo *Pseudallescheria boydii*, sob as mesmas condições, apresentou maior crescimento no tratamento KOH-água, seguido por KOH-magnésol, NaOH-magnésol e, finalmente, NaOH-água.

O fungo mostrou-se capaz de utilizar biodiesel de sebo bovino como fonte de carbono, indicando uma relação do crescimento do fungo *Pseudallescheria boydii* nas quatro condições de produção de biodiesel com relação à degradação dos ésteres.

As medidas de tensão superficial, bem como as de pH, obtidas nos tratamentos em que se inoculou o fungo, não indicaram produção de biossurfactantes e metabólitos com caráter ácido, quando comparadas aos tratamentos controle. As análises de índice de emulsificação confirmaram que, nestas condições, o fungo não produziu nenhum produto emulsificante.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi conduzido no âmbito dos projetos associados ao estabelecimento de processos microbianos no biodiesel estocado, ora desenvolvido pelas equipes integrantes da Rede Brasileira de Estudos e Projetos sobre Estabilidade, Armazenamento e Problemas Associados (REDE ARMAZBIODI), iniciativa financiada com recursos do MCT e da FINEP.

Os autores agradecem ao MCT e FINET, pelo apoio financeiro, e ao CNPq, pelas bolsas concedidas.

## REFERÊNCIAS

- ANP. 2008. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Especificação do Biodiesel. Resolução ANP Nº 7 de 19 de março de 2008. *D.O.U.* 20.03.2008, *Seção 1*, Nº 55: 37-38.
- ANP. 2009. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução CNPE Nº 6 de 16 de setembro de 2009. *D.O.U.* 26.10.2009, *Seção 1*: 16.
- BENTO, F. M., CAMARGO, F.A.O., GAYLARDE, C.C., VISCARDI, S. L., MENENDEZ, A. & DARODA, R. 2006. Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. *Revista Biodiesel*, 4: 24-26.
- BENTO, F. M. & GAYLARDE, C.C. 2001. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 47(2): 107-112
- BENTO, F.M., BEECH, I.B., GAYLARDE, C.C., ENGLERT, G.E. & MULLER, I.L. 2005. Degradation and corrosive activities of fungi in

- a diesel-mild steel-aqueous system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21(2): 135-142.
- BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O. & GAYLARDE, C.C. 2008. Biosurfactantes. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.151-184.
- BÜCKER, F., SANTESTEVAN, N. A., JACQUES, R. J. S., PERALBA, M. C., CAMARGO, F. A. O., GAYLARDE, C. C. & BENTO, F. M. 2011. Impact of Biodiesel on Biodeterioration of Stored Brazilian Diesel Oil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(1): 172-178..
- CAVALCANTI, E. 2009. Estabilidade do Biodiesel e Misturas. *Revista BiodieselBr*, 13: 71-73.
- FERREIRA, J. P. M. 2004. Tensão Superficial - sua natureza e efeitos. *Química, Boletim da SPQ*, 93: 43-48.
- FRANÇA, F. P., VIEIRA, D.M. & CAVALCANTI, E. 2011. Biodegradation of soy biodiesel by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pichia guilliermondii*. *Canadian Journal of Pure and Applied Sciences*, 5(1): 1355-1361.
- GAYLARDE, C.C., BENTO, F. & KELLEY, J. 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Brazilian Journal of Microbiology*, 30(1): 1-10.
- JANDA-ULFI, K., ULFI, K., CANO, J. & GUARRO, J. 2008. A study of the growth of *Pseudallescheria boydii* isolates from sewage sludge and clinical sources on tributyrin, rapeseed oil, biodiesel and diesel oil. *Ann Agric. Environ. Med.*, 15: 45-49.
- KNOTHE, G., GERPEN, J. V., KRAHL, J. & RAMOS, L. P. 2006. *Manual de Biodiesel*. São Paulo: Ed. Edgard Blucher.
- LÔBO, I. P., FERREIRA, S.L.C. & CRUZ, R. S. 2009. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, 32(6): 1596-1608.
- MARIANO A.P., TOMASELLA R.C., OLIVEIRA L.M., CONTIERO J. & ANGELIS D.F. 2008. Biodegradability of diesel and biodiesel blends *Afr. J. Biotechnol.*, 7: 1323.
- MOURA, K. R. M., SILVA, F. C., BRANDÃO, K. S. R., SOUZA, A. G. & CONCEIÇÃO, M. M. 2006. Estabilidade Térmica do sebo bovino e do Biodiesel Metílico e Caracterização Físico-Química. In: I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2006, Brasília. Artigos técnico-científicos.
- OLIVEIRA, D. M. 2008. *Biodegradação de Biodiesel de Origem Animal*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2008.
- OWSIANIAK, M., CHRZANOWSKI, L., SZULC, A., STANIEWSKI, J., OLSZANOWSKI, A., OLEJNIK-SCHMIDT, A.K. & HEIPIEPER, H. J. 2009. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. *Bioresour. Technol.* 100(3): 1497-1500.
- PINTO, A. C., GUARIEIRO, L. L. N., REZENDE, M. J. C., RIBEIRO, N. M., TORRES, E. A., LOPES, W. A., PEREIRA, P. A. & DE ANDRADE, J. B. 2005. Biodiesel: An Overview. *J. Braz. Chem. Soc.*, 16: 1313.
- RICHARD, J.Y. & VOGEL, T.M. 1999. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44(2-3): 93-100.
- SCHULTZ, F. M. 2010. *Biorremediação de solos contaminados com diesel e misturas de biodiesel*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- SIEGERT, W. 2009. Microbial contamination in diesel fuel - are new problems arising from biodiesel blends? In: IASH 2009 - 11 th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, Prague, Czech Republic, 18-22, October, 2009.
- TEIXEIRA, G.A.A., QUEIROZ, N., SOUZA, A. L., GARCIA, I. M., MAIA, A. S. & SOUZA, A. G. 2010. Avaliação dos Parâmetros de Qualidade para o Biodiesel Metílico Obtido de Misturas de Óleos Vegetais e Gordura Animal durante Armazenamento. In: 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2010, Belo Horizonte. *Anais...* vol. 3. p. 1287-1288.