



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102012018411-7 A2



(22) Data do Depósito: 24/07/2012

(43) Data da Publicação: 26/04/2016

(RPI 2364)

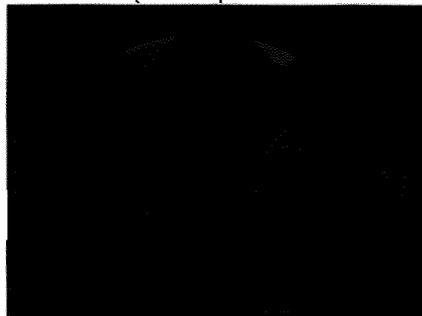
(54) **Título:** PROCESSO PARA BIODETERIORAÇÃO E/OU BIORREMEDIAÇÃO DE BODIESEL, BODIESEL BIODETERIORADO E/OU BIORREMEIADO, USO DE MACROPHOMINA PARA BIODETERIORAÇÃO E/OU BIORREMEDIAÇÃO DE BODIESEL

(51) **Int. Cl.:** C02F 101/32; C02F 3/34

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

(72) **Inventor(es):** CLAUDIA SCHINKE, JOSÉ CARLOS GERMANI, IGOR VILLELA MARRONI

(57) **Resumo:** PROCESSO PARA BIODETERMINAÇÃO E/OU BIORREMEDIAÇÃO DE BODIESEL, BODIESEL BIODETERIORADO E/OU BIORREMEIADO, USO DE MACROPHOMINA PARA BIODETERIORAÇÃO E/OU BIORREMEDIAÇÃO DE BODIESEL. A presente invenção descreve um novo e inventivo processo de biodeterioração e/ou biorremediação utilizando fungos da espécie *Macrophomina*, preferencialmente da espécie *Macrophomina phaseolina*. especificamente, a presente invenção compreende a biodeterioração e/ou biorremediação de ésteres metílicos e, ou etílicos, de ácidos graxos de origem vegetal ou animal. Preferencialmente, a presente invenção é aplicada a biodiesel.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO PARA BIODETERIORAÇÃO E/OU BIORREMEDIAÇÃO DE
BIODIESEL, BIODIESEL BIODETERIORADO E/OU BIORREMEIADO, USO DE
Macrophomina PARA BIODETERIORAÇÃO E/OU BIORREMEDIAÇÃO DE
BIODIESEL

Campo da Invenção

A presente invenção descreve um novo e inventivo processo de biodeterioração e/ou biorremediação utilizando fungos da espécie *Macrophomina*, preferencialmente da espécie *Macrophomina phaseolina*. Especificamente, a presente invenção compreende a biodeterioração e/ou biorremediação de ésteres metílicos e, ou etílicos, de ácidos graxos de origem vegetal ou animal. Preferencialmente, a presente invenção é aplicada a biodiesel. A presente invenção se situa nos campos da engenharia química.

Antecedentes da Invenção

A demanda por novas enzimas de uso industrial continuamente estimula a procura e o isolamento de novos microorganismos.

Macrophomina phaseolina é um fungo filamentosos fitopatogênico não específico que parasita uma grande variedade de plantações economicamente importantes como, por exemplo, feijões, milho, girassóis, entre outros.

Há poucos documentos descrevendo as enzimas extracelulares produzidas por esse fungo.

A presente invenção descreve um processo de biodeterioração e/ou biorremediação utilizando fungos *Macrophomina*, preferencialmente da espécie *Macrophomina phaseolina* em que o fungo é um agente biológico atuante na descontaminação, tanto de superfícies, quanto de líquidos aquosos e orgânicos, contaminados com biodiesel. Como modo de ação, os resultados apresentados na presente invenção indicam que o potencial desse fungo está

preferencialmente relacionado à produção de hidrolases extracelulares e às altas taxas de crescimento do mesmo.

A busca na literatura patentária apontou alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir.

5 O documento US 11/367,962 descreve um dispositivo para biodegradação de hidrocarbonetos fluidos utilizando *M. phaseolina* (US 11/367,962 e CA 2580175 de 03/set/2007, inventor W. Scott Calahan, com título "Device and method for collection and biodegradation of hydrocarbon fluids"). Neste caso trata-se de um dispositivo que contém um conjunto de
10 microorganismos, entre eles *M. phaseolina*, destinado à biodegradação de hidrocarbonetos fluidos, derivados de petróleo.

Hidrocarbonetos e biodiesel são compostos de estruturas químicas e propriedades químicas completamente diferentes entre si, exigindo para sua biodegradação e/ou biorremediação rotas bioquímicas diferentes apesar de
15 utilizar o mesmo microrganismo. Portanto, o presente invento em nada se sobrepõe ao acima citado (US 11/367,962).

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva
20 frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção proporciona um processo para eliminar biodiesel de líquidos aquosos e ou superfícies sólidas sem a utilização
25 de compostos químicos, sendo, portanto, um processo barato. A não utilização de compostos químicos no processo evita a geração de resíduos químicos, os quais necessitam de descarte apropriado e, geralmente, caro. Os resíduos gerados pela presente invenção são menos tóxicos que o contaminante, não necessitando de descarte especial. A presente invenção pode ser utilizada em
30 toda cadeia produtiva do biodiesel (produção, distribuição, consumo). *Macrophomina phaseolina* pode ser utilizada como agente biológico para a

descontaminação, tanto de superfícies, quanto de líquidos aquosos e orgânicos, contaminados com biodiesel.

É, portanto, um objeto da presente invenção, um processo de biodeterioração e/ou biorremediação de biodiesel compreendendo a etapa de contatar pelo menos um fungo *Macrophomina* com biodiesel.

Em uma configuração preferencial, o fungo é *Macrophomina phaseolina*

Em uma configuração opcional, o processo compreende adicionalmente pelo menos uma das seguintes etapas:

- a) realizar o contato do microorganismo com biodiesel em aerobiose e, preferencialmente sob agitação;
- b) realizar o contato do microorganismo com biodiesel sob temperaturas de 25°C a 35 °C, preferencialmente 30°C;
- c) realizar o contato do microorganismo com biodiesel em pH 4,5 a pH 7, preferencialmente pH 5,5;
- d) realizar a ação de biorremediação e, ou ação de biodegradação entre 48 a 96 horas, preferencialmente 72 horas.

É ainda um objeto adicional da presente invenção, o biodiesel obtido pelo processo de biodeterioração e/ou biorremediação de biodiesel compreendendo a etapa de contatar pelo menos um fungo *Macrophomina* com biodiesel.

É ainda um objeto adicional da presente invenção, o uso de *Macrophomina* para biodeterioração e/ou biorremediação de biodiesel.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

Fig. 1 Visualização sob luz ultravioleta 350 nm do meio de cultivo semi-sólido contendo biodiesel logo após a inoculação com *Macrophomina*.

Fig. 2 Visualização sob luz ultravioleta 350 nm do meio de cultivo semi-sólido contendo biodiesel após 3 dias da inoculação com *Macrophomina*. Durante seu desenvolvimento a *Macrophomina* biodegrada o biodiesel do meio de cultivo, o que fica evidenciado pela coloração amarelo-alaranjada do meio quando visualizado sob luz UV a 350 nm.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

A presente invenção demonstra um processo para tratamento de líquidos aquosos, líquidos orgânicos e, ou superfícies contaminados por biodiesel (ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos), através da biodeterioração e, ou biorremediação utilizando um fungo filamentosos. Dito fungo pertence ao phylum Ascomycota, gênero *Macrophomina*, espécie *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

O fungo filamentosos *Macrophomina phaseolina* utiliza biodiesel como fonte de carbono para sua manutenção e multiplicação celular. O contato do fungo filamentosos, seja como células livres, seja como células imobilizadas, ou células encapsuladas, ou células de alguma forma presas por entrelaçamento de matriz ou por ancoragem em uma matriz, com o biocombustível promove a degradação do mesmo, descontaminando o meio ambiente ou superfícies que o contenha.

O meio contaminado, sólido ou líquido aquoso ou líquido orgânico, tem seu pH corrigido e é inoculado com o fungo filamentosos. Ocorre a degradação do biodiesel e ao final do tempo de incubação o contaminante foi transformado em compostos menos tóxicos.

A biomassa do fungo é retirada do meio líquido ou da superfície sólida, podendo ser reaproveitada num próximo ciclo, ou sofre esterilização por algum processo químico ou físico, sendo encaminhada para descarte apropriado. O

líquido aquoso ou orgânico ou a superfície sólida descontaminados do biodiesel sofrem algum processo de esterilização por método químico ou físico, e são devolvidos ao ambiente ou encaminhados para descarte adequado.

A degradação do biodiesel é efetuada em aerobiose e, preferencialmente sob agitação. O microrganismo atua em temperaturas de 25°C a 35 °C, sendo a ótima 30°C. O pH em que atua varia de pH 4,5 a pH 7, sendo o ótimo pH 5,5. O tempo para a ação de biorremediação e, ou ação de biodegradação, pode variar entre 48 a 96 horas, geralmente 72 horas.

Foram testadas as temperaturas de incubação de 25°C a 35°C por 48 a 120 horas. Nas temperaturas de 30°C a 32°C o fungo hidrolisa o biodiesel rapidamente, e a colônia cresce de forma acelerada. Temperaturas de incubação de 35°C ou acima, bem como 25°C ou abaixo, diminuem a taxa de crescimento da colônia e, por consequência, a utilização do biocombustível.

A ação de biodegradação e ou biorremediação ocorre com biodiesel em concentrações de 1 a 20% no meio de cultivo.

O fungo se desenvolve bem na faixa de pH 5,5 a 7,0, preferencialmente em pH 5,5. Em pH 4,5 o crescimento ocorre menos intenso.

Os experimentos foram realizados com 13 (treze) isolados do fungo filamentososo e 11 deles apresentaram a capacidade de degradar o biodiesel.

Foram efetuados cultivos do fungo em meio semi-sólido ou meio líquido conforme descrito na tabela 1 e tabela 2

Tabela 1 – Descrição do meio semi-sólido em que foi efetuado o cultivo dos fungos.

Peptona	0,2% (p/v)	Biodiesel	1 a 5% (v/v)
Extrato de carne	0,15% (p/v)	Ágar	1,2 % (p/v)
NaCl	0,2% (p/v)	Água destilada	100 mL

Tabela 2 – Descrição do meio líquido em que foi efetuado o cultivo dos fungos

Peptona	0,2% (p/v)	Biodiesel	5 a 20 % (v/v)
Extrato de carne	0,15% (p/v)	Água destilada	100 mL
NaCl	0,2% (p/v)		

A presente invenção pode ser utilizada na forma de células livres, ou células de alguma forma imobilizadas ou encapsuladas, de *M. phaseolina* em biorreatores ou em lagoas na biodeterioração de águas residuais e efluentes contaminados com biodiesel, como por exemplo, nas estações de tratamento de águas de usinas produtoras do biocombustível. Também é possível utilizar as acima citadas células do fungo filamentosso em dispositivos que promovam a contenção dessas células, porém permitam o contato do meio líquido aquoso ou orgânico com as mesmas, para a biorremediação da contaminação ambiental causada pelo derramamento de biodiesel em diferentes corpos de água como lagos, rios e mar. Ditas células também podem ser utilizadas para a degradação do biodiesel contaminante de superfícies sólidas, por exemplo, margens de rios ou lagos, cujas areias ficam contaminadas após derramamento acidental do biocombustível, seja por aplicação direta sobre a superfície no ambiente, seja por processamento em biorreator.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outros variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

PROCESSO PARA BIODETERIORAÇÃO E/OU BIORREMEDIAÇÃO DE
BIODIESEL, BIODIESEL BIODETERIORADO E/OU BIORREMEIADO, USO DE
Macrophomina PARA BIODETERIORAÇÃO E/OU BIORREMEDIAÇÃO DE
5 BIODIESEL

1. Processo de biodeterioração e/ou biorremediação de biodiesel caracterizado por compreender a etapa de contatar pelo menos um fungo *Macrophomina* com biodiesel.
- 10 2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fungo ser *Macrophomina phaseolina*.
3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por adicionalmente compreender pelo menos uma das seguintes etapas:
 - 15 a) realizar o contato do microorganismo com biodiesel em aerobiose;
 - b) realizar o contato do microorganismo com biodiesel sob temperaturas de 25°C a 35 °C;
 - c) realizar o contato do microorganismo com biodiesel em pH 4,5 a pH 7;
 - 20 d) realizar a ação de biorremediação e, ou ação de biodegradação entre 48 a 96 horas.
4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por realizar o contato do microorganismo com biodiesel em aerobiose sob agitação.
- 25 5. Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por realizar o contato do microorganismo com biodiesel sob temperatura de 30°C.
6. Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por realizar o contato do microorganismo com biodiesel em pH 5,5.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por realizar ação de biodegradação em 72 horas.
- 5 8. Biodiesel caracterizado por ser obtido pelo processo de biodeterioração e/ou biorremediação de biodiesel compreendendo a etapa de contatar pelo menos um fungo *Macrophomina* com biodiesel, de acordo com a reivindicação 1.
9. Uso de *Macrophomina* caracterizado por ser para biodeterioração e/ou biorremediação de biodiesel.
- 10 10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por ser *Macrophomina phaseolina*.

FIGURAS

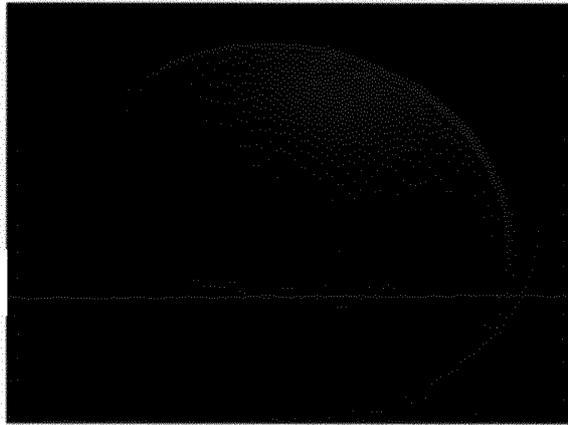


Figura 1

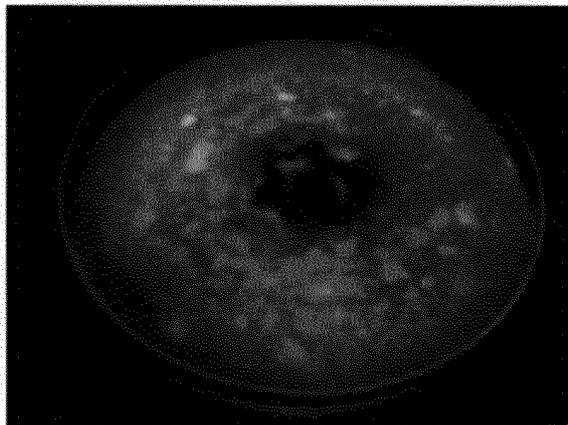


Figura 2

Resumo

PROCESSO PARA BIODETERIORAÇÃO E/OU BIORREMEDIAÇÃO DE
BIODIESEL, BIODIESEL BIODETERIORADO E/OU BIORREMEIADO, USO DE
Macrophomina PARA BIODETERIORAÇÃO E/OU BIORREMEDIAÇÃO DE
BIODIESEL

A presente invenção descreve um novo e inventivo processo de biodeterioração e/ou biorremediação utilizando fungos da espécie *Macrophomina*, preferencialmente da espécie *Macrophomina phaseolina*.
10 Especificamente, a presente invenção compreende a biodeterioração e/ou biorremediação de ésteres metílicos e, ou etílicos, de ácidos graxos de origem vegetal ou animal. Preferencialmente, a presente invenção é aplicada a biodiesel.