

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ÁREA DE MICROBIOLOGIA APLICADA)

---

# BIODEGRADAÇÃO DE BIODIESEL DE ORIGEM ANIMAL

**DANILLA MARQUES DE OLIVEIRA**

Dissertação de Mestrado elaborada junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Aplicada. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro.

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ÁREA DE MICROBIOLOGIA APLICADA)


---

# BIODEGRADAÇÃO DE BIODIESEL DE ORIGEM ANIMAL

DANILLA MARQUES DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Roberto Naves Domingos

Co-orientadora: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis



Dissertação de Mestrado elaborada junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Aplicada. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro.

Rio Claro

Estado de São Paulo – Brasil

Outubro/2008

O48b 576 Oliveira, Danilla Marques de  
Biodegradação de biodiesel de origem animal / Danilla  
Marques de Oliveira. – Rio Claro : [s.n.], 2008  
64 f. : il., tabs, gráfs., fots., figs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Roberto Naves Domingos  
Co-orientador: Dejanira de Francheschi de Angelis

1. Microorganismos. 2. Candida viswanathii. 3.  
Respirometria. I. Título.

Dedico este trabalho à minha mãe  
Izilda e a meu pai Avercídio, que  
sempre me apóiam em minhas  
decisões.

## AGRADECIMENTOS.

Este trabalho foi realizado com a participação de muitas pessoas que gostaria de agradecer:

Aos professores Dr. Roberto Naves Domingos e Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, pela orientação e paciência;

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e me ajudaram em tudo que podiam;

Ao meu irmão Leandro, por estar junto de mim para resolver os problemas;

Aos amigos do Departamento de Microbiologia e Bioquímica, técnicos, estagiários e professores, que ajudaram neste trabalho;

Aos meus amigos de Pós Graduação, do Coral Uirapuru, do Teatro do SESI, do Projeto Preserve o Planeta Terra, que ensinaram muitas coisas importantes para minha vida.

## ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1. Óleos e suas propriedades. ....	3
3.1.1. A importância dos óleos.....	4
3.1.2. Catabolismo dos ácidos graxos.....	5
3.2. Combustíveis.....	7
3.2.1. Petróleo como combustível fóssil .....	7
3.2. Hidrogênio.....	8
3.2.3. Carvão.....	11
3.2.4. Biomassa.....	12
3.2.5. Álcool – etanol.....	12
3.2.6. Biodiesel.....	14
3.2.5.1. Matérias primas produtores de biodiesel.....	21
Amendoim. ....	21
Soja.....	22
Dendê.....	23
Babaçu.....	23
Mamona.....	24
Óleos e gorduras animais.....	25
Microorganismos.....	28
3.3. Biorremediação.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Materiais.....	35
4.2. Métodos.....	36
4.2.1. Isolamento .....	36
4.2.2. Procedimento para identificar a levedura.....	36
4.3. Ensaio com a levedura.....	36
4.3.1. Adaptação e manutenção da levedura.....	36
4.3.2. Obtenção de inóculo para o ensaio respirométrico. ....	37

4.3.3.	Método de coleta e preservação do solo.....	37
4.3.4.	Caracterização físico química do solo.....	38
4.3.5.	Capacidade de Campo.....	38
4.3.6.	Acompanhamento da biodegradação da amostra biocombustível em respirômetros de Bartha & Pramer utilizando diferentes quantidades de água. ....	38
4.3.7	pH do solo .....	41
4.3.8	Solubilização do solo .....	41
4.3.9.	Verificação da toxicidade a <i>Daphnia similis</i> .....	41
4.3.10.	Cálculos.....	41
	Produção de CO <sub>2</sub> (CO <sub>2p</sub> ).....	41
	Carbono Biodegradado (C <sub>b</sub> ) .....	42
	Eficiência de Biodegradação (EB) .....	42
4.3.11.	Quantificação do número de bactérias e fungos dos tratamentos do ensaio respirométrico.....	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
5.1.	Identificação de Levedura.....	43
5.2.	Caracterização física e química do solo.....	44
5.3.	Ensaio respirométrico.....	45
	Quantidade do gás carbônico produzido por dia de tratamento.	45
5.4.	Quantificação de Carbono Biodegradado	47
5.5.	pH dos tratamentos.....	48
5.6.	Toxicidade dos tratamentos a <i>Daphnia similis</i>	49
5.7.	Plaqueamento e contagem dos microrganismos em unidades formadoras de colônias g/solo dos tratamentos.....	50
5.8.	Eficiência da respirometria.....	52
6.	CONCLUSÃO.....	53
7.	REFERÊNCIAS.....	54

## RESUMO

Isolou-se uma cepa de levedura do tratamento biológico do efluente da Refinaria de Paulínia – SP. Esta levedura foi submetida a alguns ensaios preliminares e mostrou-se capaz de biodegradar lipídios vegetais, gorduras animais e hidrocarbonetos. Diante destas características metabólicas providenciou-se a sua taxonomia resultando após análise molecular do genoma na espécie *Candida viswanathii*. Pelas suas propriedades hidrolíticas, procurou-se verificar nesta pesquisa a sua capacidade de degradar biodiesel de origem animal, mediante o emprego do método respirométrico de Bartha e Pramer. Como suporte para esta avaliação utilizou-se solo arenoso, pH 4,0, 8,0g/dm<sup>3</sup> de matéria orgânica, coletado na Estação Ecológica de Itirapina, coordenadas geográficas (S 21°13'V e 0 47° 49'W). Procurou-se avaliar a capacidade de biodegradar biodiesel desta levedura com a quantidade de água sugerida no próprio método de respirometria isto é, de 70% da capacidade de campo (CC) e com quantidade adicional para 90% da CC. Constatou-se nos experimentos realizados que capacidade de campo diminui a eficiência da respirometria no tratamento em que havia biodiesel e o solo apresentava 90% da CC. Nos tratamentos com levedura e biodiesel tanto em 70 como 90% da CC houve maior evolução de CO<sub>2</sub>. Comparando-se os ensaios com biodiesel e adição da levedura, verificou-se que na ausência da *C. viswanathii* a produção de CO<sub>2</sub> foi 4% menor. Nos tratamentos em que apenas o biodiesel foi acrescentado verificou-se que a microbiota autóctone do solo também promove a biodegradação e conseqüente biorremediação indicando que, mesmo os microrganismos existentes no solo possuem a capacidade de degradar biodiesel e promover a biorremediação.

Palavras chave: *Candida viswanathii*, biodegradação, biodiesel, respirometria

## ABSTRACT

A stream of yeast was isolated from biological treatment of effluent from the refinery in Paulinia - SP. This yeast has been subjected to some preliminary tests and was capable of biodegradability vegetable oil, animal fat and hydrocarbon. Facing these metabolic characteristics, has provided its taxonomy and after molecular analysis of the genome resulted in *Candida viswanathii* species. For its hydrolytic properties, this research tried to verify its ability to degrade biodiesel from animal fat, by the use of the of Bartha and Pramer's respirometry method. As support for this research, was utilized a sandy soil, pH 4,0; 8,0 g/dm<sup>3</sup> of organic material, collected from Itirapina's Ecologic Station, geographic co-ordinates (S 21° 13'V and 0 47° 49'W). *C. viswanathii* was isolated from oil refinery effluent after biological treatment. The research evaluated the yeast's capacity of biodiesel degradation with the same quantity of water suggested by respirometric method, which means, at 70% of field capacity (FC) and with additional quantity to 90% of FC. It was found on the control experiments realized that the respirometric's efficiency was lower in the treatment with biodiesel and the soil was 90% of FC (with more quantity of water). On treatments those containing the yeast and biodiesel, either at 70 or 90% FC there were more production of CO<sub>2</sub>. Comparing the treatments with biodiesel and yeast's addition, it was found that the production of CO<sub>2</sub> decreases 4% in the yeast absence. On treatments where only biodiesel was added it was observed that the soil's autochthon microbiota also promoted the biodegradation and consequent bioremediation. This result indicates that even microorganisms from soil have the capacity to degrade biodiesel and promote the bioremediation of contaminated areas.

Key words: *Candida viswanathii*, biodegradation, biodiesel, respirométrico

## **1. INTRODUÇÃO**

Os óleos representam um importante papel na vida de todos, incluindo desde a constituição de todas as células, material genético, na alimentação, componentes recompositores de deficiências na farmacologia, na produção de biossurfactantes no processo de higienização dos corpos e materiais, na preservação da pele como cosméticos e ainda na combustão para geração de luz e de energia. Com a descoberta do petróleo e o desenvolvimento da petroquímica gerando mercado de combustíveis, o setor considerava-se totalmente preenchido. Entretanto com o alto consumo e a preocupação da escassez deste recurso, seu custo está tornando-se elevado. Com o desgaste dos recursos naturais e a preocupação com o meio ambiente, cientistas procuram desenvolver novos combustíveis derivados de fontes renováveis para substituir a energia fóssil vinda do petróleo. Entre as possíveis alternativas dos combustíveis para economizar o petróleo e o carvão, podem ser citadas aquelas que vão desde a queima de resíduos produzidos pelas indústrias, para conter seus custos, como é o caso do bagaço de cana, aproveitamento das energias solar e eólica, desenvolvimento de células combustíveis, em etapa experimental no transporte público na Alemanha. Além destas a produção do álcool como novo combustível que atingiu grande desenvolvimento entre 1975 a 1985 no programa conhecido como PROALCOOL, nos dias atuais ocorre novamente intensa expansão de produção tecnológica para introduzir o biodiesel. O biodiesel pode apresentar além do combustível uma alternativa de melhoria ambiental para o problema dos resíduos de óleos vegetais e gorduras animais já utilizados. Contudo, como premissa que todos os combustíveis, inclusive o álcool e o biodiesel podem ocasionar danos ao meio ambiente, portanto, fazem-se necessários estudos que possam auxiliar no entendimento da degradação das moléculas de origem natural, bem como aquelas quimicamente modificadas como o biodiesel.

## **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a degradação de biodiesel de origem animal utilizando o método de respirometria de Bartha & Pramer em diferentes teores de umidade e a influência da levedura *Candida viswanathii* isolada de estação de tratamento de um efluente de refinaria de petróleo.

## **2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO**

Aplicar o método respirométrico na verificação da produção de CO<sub>2</sub> partindo do biodiesel constatando a possibilidade de emprego da levedura no processo de bioaumentação dos microrganismos do solo e ainda certificar-se da toxicidade residual do solo contaminado após a biodegradação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Óleos e suas propriedades.

Os lipídios biológicos formam um grupo de compostos quimicamente diversificado, que possui a insolubilidade como característica comum a todos. Entre suas funções para os seres vivos estão a armazenagem energética, cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos que absorvem luz, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intramoleculares, componentes estruturais das membranas celulares.

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeias de hidrocarboneto variando de  $C_4$  a  $C_n$  átomos de carbono. A classificação dos ácidos graxos pode ocorrer quanto ao tamanho da cadeia ou o número de duplas ligações (CURI, 2002).

Os ácidos graxos podem ser classificados quanto ao tamanho da cadeia:

- curta - de 2 a 4 carbonos;
- média - de 6 a 10 carbonos;
- longa - acima de 12 carbonos.

Podem ser classificados quanto à insaturação (duplas ligações) como:

- Saturados – sem dupla ligação;
- Insaturados – possui uma ou mais ligações duplas, pode ser subdividido em:
  - Monoinsaturados – uma insaturação;
  - Poliinsaturados – várias insaturações.

Os óleos e gorduras são derivados dos ácidos graxos, Suas estruturas diferenciam-se pela presença de insaturações em suas cadeias. Aquelas que apresentam maiores insaturações formam dobras na cadeia levando a maior dificuldade de empacotamento entre as moléculas e diminuindo seu ponto de fusão. Gorduras insaturadas são líquidas à temperatura ambiente e são encontradas principalmente nas plantas; gorduras saturadas são sólidas e são de origem animal (RAVEN, 2008).

A nomenclatura destes compostos especifica o número de carbonos e de insaturações.

Ácido graxo Nomenclatura	Número de carbono	Insaturações	Localização de ligações duplas
Ácido Láurico C 12:0	12	0	-
Ácido Mirístico C 14:0	14	0	-
Ácido Palmítico C 16:0	16	0	-
Ácido Esteárico C 18:0	18	0	-
Ácido Oléico C 18:1 $\Delta^9$	18	1	Após o 9º carbono
Ácido Linoléico C 18:2 $\Delta^{6,9}$	18	2	Após o 6º e 9º carbonos
Ácido Linolénico C 18:3 $\Delta^{3,6,9}$	18	3	Após o 3º, 6º e 9º carbonos
Ácido Ricinoléico C 19:1 $\Delta^9$	19	1	Após o 9º carbono
Ácido Behênico C22:0	22	0	-

Fonte: LEHNINGER (2006)

Os lipídeos mais simples contendo ácidos graxos são chamados triglicerídeos. São compostos por três moléculas de ácidos graxos unidas por uma ligação éster e uma única molécula de glicerol (CURI, 2002).

### 3.1.1. A importância dos óleos

Nas células eucariontes os triglicerídeos formam gotículas no citosol que funcionam como depósitos de combustível metabólico. Nos animais superiores são armazenados em adipócitos e nas sementes como óleo que fornecem energia e precursores biossintéticos durante sua germinação. Em alguns animais servem como isolante térmico para ambientes gelados, outros, como o cachalote, utilizam para alterar sua densidade e igualar a da água em que vivem. A vantagem em utilizar a gordura como reserva energética é que como são hidrofóbicos não possui nenhum vestígio de água, permitindo a liberação do dobro da energia liberada pela mesma massa de carboidrato (LEHNINGER, 2006).

Desde os seus primórdios o óleo teve a sua importância para a humanidade que inicialmente eram usados na alimentação, cerimônias religiosas, higiene pessoal e posteriormente na indústria. As primeiras evidências de óleos modificados apresentaram-se na forma semelhante ao sabão, como registra a história datada de aproximadamente 2.800 a.C na antiga Babilônia. Os habitantes ferviam gordura juntamente com cinzas, mas não mencionam sua utilização. O uso farmacêutico do sabão encontra-se num tratado médico, que descreve a combinação de óleos animal e vegetal com sais alcalinos, usado para tratar de doenças da pele e para o banho. Os antigos povos germânicos e gauleses usavam este material para tingir seus cabelos de vermelho (MAZBRA, 2007).

Em tempos mais recentes o óleo foi utilizado como combustível para iluminação e até em construção civil. Houve no Brasil, entre os séculos XVII e XIX, grande matança de baleias a fim de conseguir gordura que era processada em grandes tachos e vendido para iluminação de casas, como lubrificante e ainda como componente para confecção da argamassa para construções, (OLIVEIRA e CARIGNATTO, 2008). Exemplo desta aplicação, destaca-se uma construção antiga que abrigava uma prisão, hoje transformada em mercado de artesanato na cidade de Recife, no Estado de Pernambuco.

Atualmente com a preocupação de gerar combustíveis de fontes renováveis, as atenções foram voltadas para a produção de óleos como matéria-prima para ser industrializado e produzir o biocombustível.

O Brasil, um país localizado na faixa tropical e equatorial do planeta, contém grande variedade de plantas que potencialmente podem gerar óleos como soja, algodão, mamona, pinhão (BIODIESELBR, 2007).

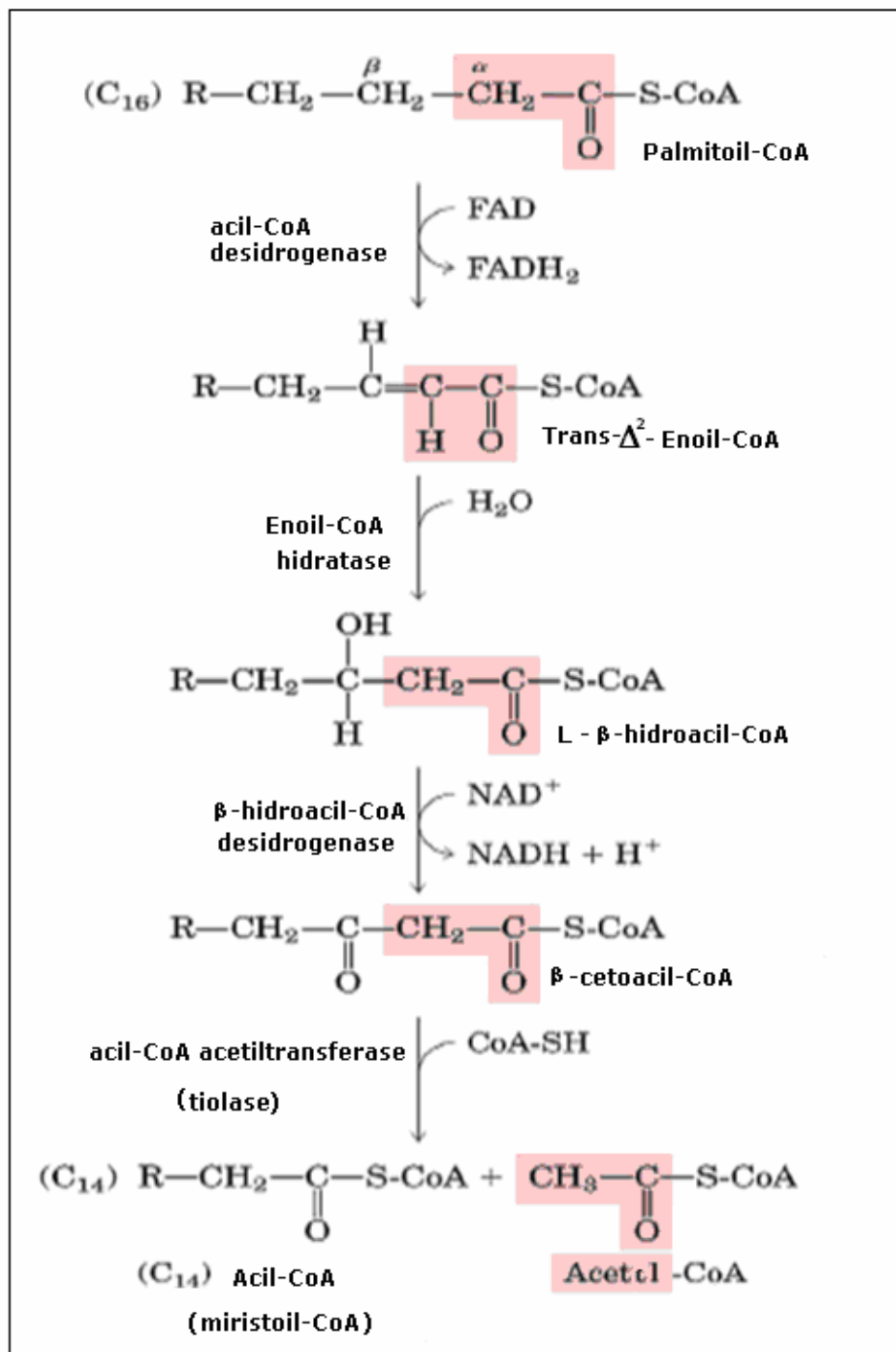
Porém, as gorduras e os óleos podem ocasionar problemas, em ocorrências acidentais como vazamentos e causar perturbação ao meio ambiente. Outra situação inconveniente gerada é com a obstrução de coletores de esgoto quando as matérias gordurosas são descartadas de maneira incorreta e podem contribuir inclusive com exalação de odores desagradáveis. Os óleos durante o descarte podem impermeabilizar o ambiente e atrair insetos e outros animais no local onde processa-se a compostagem.

### 3.1.2. Catabolismo dos ácidos graxos

A função biológica da oxidação dos ácidos graxos é semelhante entre os organismos, sendo que o mecanismo é essencialmente o mesmo num processo chamado  $\beta$ -oxidação, onde os ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA pela formação de um radical com dois carbonos a menos. Este processo possui quatro passos (CURI, 2002)

- O primeiro passo consiste na desidrogenação, onde uma isozima da acetil-CoA desidrogenase retira elétrons do acetil-CoA graxo e transfere para o FAD introduzindo uma ligação dupla entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ .
- O segundo passo é a hidratação, que há a formação do estereoisômero L do  $\beta$ -hidroacil-CoA com a adição de uma molécula de água na dupla ligação do trans -  $\Delta^2$  - enoil - CoA.
- O terceiro passo é a desidrogenação, em que o L- $\beta$ -hidroxiacil-CoA forma  $\beta$ -cetoacil-CoA pela ação da  $\beta$ -hidroxiacil desidrogenase; sendo o  $\text{NAD}^+$  o receptor de elétrons.
- O último passo é a clivagem carbono-carbono (Reação da Tiolase), a acil-CoA acetiltransferase, ou tiolase, promove a reação do  $\beta$ -cetocil-CoA com uma molécula de coenzima A livre para

romper o fragmento carboxila terminal de dois átomos de carbono do ácido graxo original na forma de acetil-CoA.



**Figura 1:** Esquema da  $\beta$ -oxidação onde um ácido graxo de 16 carbonos dá origem a outro com 14 carbonos, e sucessivamente o ciclo se repete até o radical acetato.

Fonte: LEHNINGER, 2006

## **3.2. Combustíveis**

### **3.2.1. Petróleo como combustível fóssil**

Desde meados do século XIX, para maior conforto da população, introduziu-se a iluminação pública que utilizava como combustível querosene e em algumas áreas, gás natural. Neste período houve crescimento na área de transportes motorizados. Estas duas atividades levaram ao desenvolvimento da indústria do petróleo. Atualmente, o petróleo fornece a maior parte da energia mundial, sendo que o setor de transporte é o de maior consumo, além disso, é a principal fonte de energia para muitas outras finalidades. O petróleo após seu refino, mediante o desenvolvimento da petroquímica, tornou-se fonte de milhares de produtos (AMBIENTE BRASIL, 2006).

Segundo a Agência Internacional de Petróleo, o Oriente Médio detém cerca de 75% das reservas mundiais de petróleo. Tais reservas estão distribuídos na Arábia Saudita (26,18%), Iraque (11,25%), Emirados Árabes (9,7%), Kuwait (9,65%) e Irã (8,97%). As demais porcentagens estão distribuídas entre Venezuela 7,77%, Rússia 4,86%, Estados Unidos 3,04%, Líbia 2,95%, México 2,69% e o restante do mundo com 12,8% (SCIARRETTA, 2003).

Apesar de várias medidas de segurança adotadas para evitar que acidentes ambientais com petróleo desde sua extração, manuseio, refino, transporte e seus derivados não ocorram, existe sempre a probabilidade de incorrer por erros humanos e/ou falhas técnicas. Quando acidentes, especialmente com navios petroleiros têm acontecido muitas pesquisas têm sido geradas. Os estudos mais abrangentes incluem o impacto no ambiente marinho, especialmente em praias, costões e mangues. Em ambientes de água doce e superfície terrestre, existem poucas informações, considerando que existam diferentes tipos de petróleo e bem como regiões diversificadas que podem ser atingidas (VAL, 2005).

Conhecendo-se melhor as jazidas petrolíferas, e se o consumo de petróleo mantiver no mesmo ritmo, as reservas quantificadas hoje serão suficientes para abastecer o mercado apenas por mais 40 anos. Contudo, desde a primeira crise de carência no abastecimento do petróleo, em 1974, os países dependentes deste combustível procuram novas fontes de energia, além de produzirem mais tecnologias com maior eficiência para uso adequado dos seus derivados (SCIARRETTA, 2003).

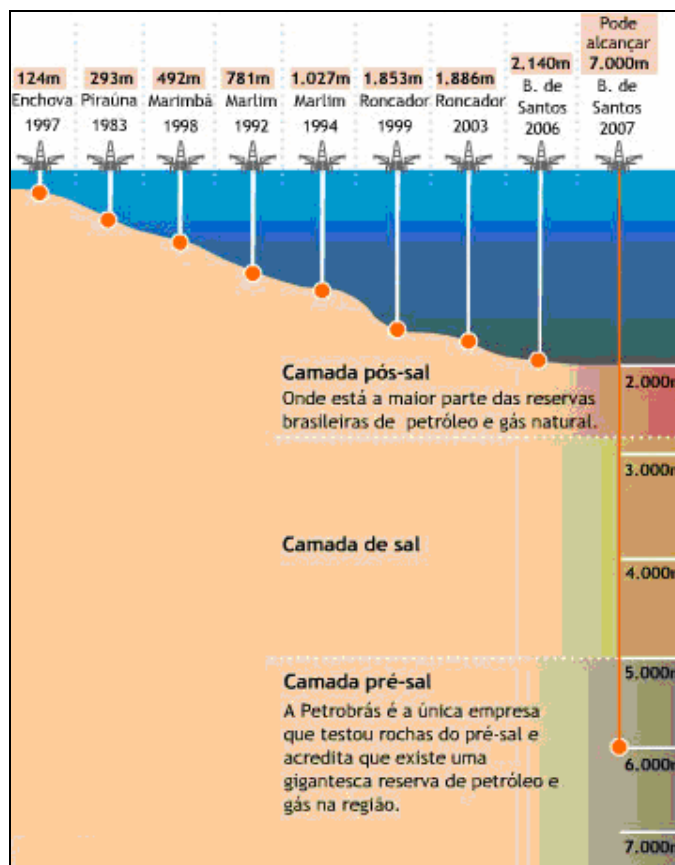
Acreditava-se que reservas brasileiras de petróleo seriam capazes de suprir as necessidades nacionais, durante 20 a 30 anos (GOLDEMBERG, 1998).

Porém com a descoberta de óleo na camada pré-sal nos campos de Tupi e Iara, ambos na bacia de Santos, aumentam para 14 milhões de barris a reserva de petróleo nacional (OLIVEIRA, 2008 e O GLOBO, 2008).

O óleo encontrado é leve e considerado de melhor qualidade comercial que a média do petróleo encontrado no Brasil. Antes da descoberta destes campos o maior campo da estatal era o

do Roncador, com uma reserva de aproximadamente 3 bilhões de barris de petróleo, mas o produto no local é pesado, de menor valor comercial (O GLOBO, 2008).

A camada Pré-sal são reservatórios que se encontram abaixo de uma extensa camada de sal, que abrange o litoral do Estado do Espírito Santo até Santa Catarina, ao longo de mais de 800 km de extensão por até 200 km de largura, em lâmina d'água que varia de 1.500m a 3.000m e soterramento entre 3.000 e 4.000 metros (BARBASSA, 2008).



**Figura 2:** Esquema das reservas de petróleo brasileiro.

Fonte: O GLOBO, 2008.

### 3.2. Hidrogênio

As células combustíveis são baterias de funcionamento contínuo onde ocorre a combustão eletroquímica a frio de um comburente gasoso que resulta numa corrente elétrica. O gás mais utilizado neste processo é o hidrogênio (WENDT et al, 1999).

O hidrogênio gasoso na natureza é emitido por vulcões, minas de carvão, poços de petróleo e metabolismo microbiano. O hidrogênio, obtido mediante a eletrólise da água ou de processos químicos, é amplamente utilizado em tratamentos térmicos, puro ou combinado com nitrogênio, na

produção de amônia sintética e metanol, no refino de petróleo, como um redutor de atmosfera e no combustível de foguetes (AMBIENTE BRASIL, 2006).

Para formar a água, hidrogênio combina-se com o oxigênio na forma de uma forte explosão. A grande vantagem desta combustão é sua inocuidade como geradora de poluição uma vez que o único subproduto gerado é a água. Entretanto, existem vários problemas nessa utilização. Embora o hidrogênio seja um elemento abundante na natureza, comparando porcentualmente os gases atmosféricos os processos utilizados para sua separação exigem consumo de energia, o que torna seu uso pouco econômico. Além disso, dada sua alta capacidade combustível e explosiva, seu armazenamento e manipulação oferecem grandes riscos (BRANCO, 1990).

O desenvolvimento técnico de células combustíveis procura a independência de gases puros para seu funcionamento (WENDT et al, 1999).

Recentemente, Spivey e Egebebi (2007) relataram que o gás hidrogênio tem sido visto sob nova óptica. A sua obtenção a partir da matéria orgânica e biomassa renovável despertou a atenção para a geração do gás de síntese. Neste processo a biomassa é gaseificada em cerca de 98% por um processo de combustão. A gaseificação é um processo termoquímico no qual a biomassa reage com o ar ou oxigênio e por aquecimento gera CO; CO<sub>2</sub>; H<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O conhecido como gás de síntese. Esta mistura pode ser utilizada para estabelecer muitas tecnologias como a via do processo de Fischer-Tropsch, que preconiza a síntese de hidrocarbonetos. Mediante o uso de biomassa derivada do gás de síntese podem ser produzidos álcoois, que na verdade tem recebido pouca atenção, embora tenha potencial para produção de etanol e butanol. Entre os processos para produzir etanol a partir da gaseificação da biomassa (resíduos florestais, resíduos animais) que tem uma mistura de gases razoavelmente consistente tem-se:

- fermentação a baixas temperaturas para produção de etanol de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>;
- síntese catalítica gerando misturas de álcoois ou misturas de moléculas oxigenadas;

Reação de hidrogenação do CO para etanol:



$$\Delta H_i = -61,20 \text{ Kcal mol}^{-1}$$

$$\Delta G_i = -29,32 \text{ Kcal mol}^{-1}$$

Pela via fermentativa o etanol a partir do gás de síntese pode ser obtido empregando-se bactérias via processo anaeróbio. Um dos microrganismos utilizado é a bactéria do gênero *Clostridium ljungdahlii* ATC-C55383, que sob condições especiais converte pelo seu metabolismo CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> em uma mistura de acetato e etanol.

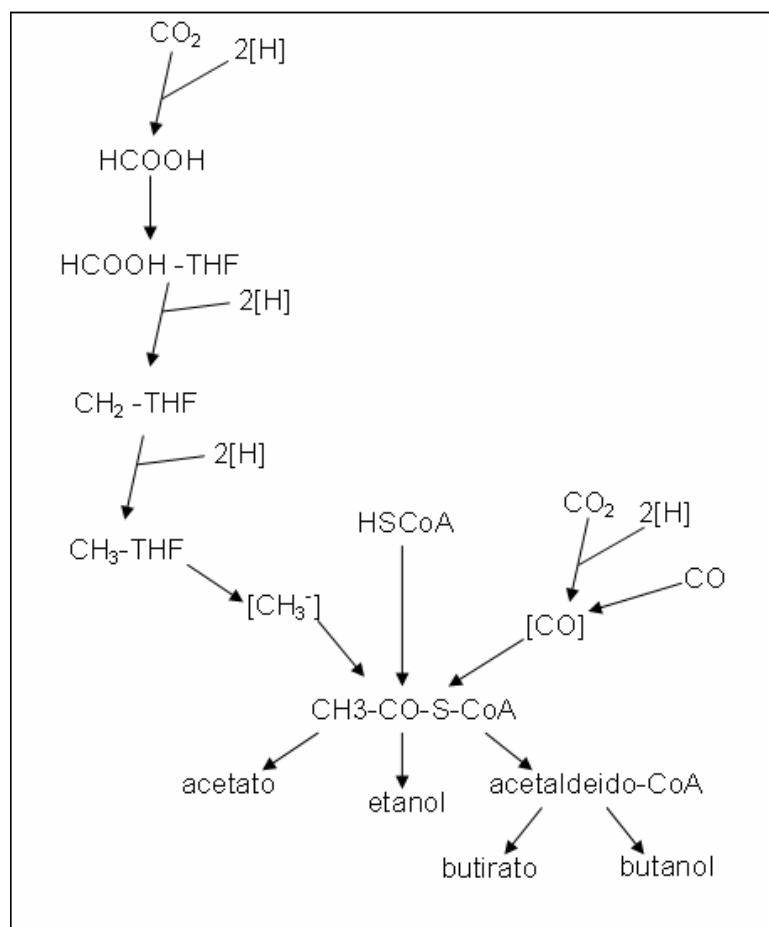
Henstra et al (2007), descrevem que, a fermentação do gás de síntese pode ser elaborada por microrganismos chamados de carboxidotróficos onde destacam-se:

<b>Bactérias mesófilas</b>	Temp. ótimo °C	pH ótimo	tempo h	Produtos
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	37	5,8 - 6,0	-	acetato, etanol
<i>Clostridium ljingdahllii</i>	37	6,0	3,8	acetato, etanol
<i>Clostridium carboxidovorans</i>	38	6,2	6,25	acetato, etanol, butirato, butanol
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	37	6,0	12 - 20	acetato, etanol, butirato, butanol
<b>Archaea mesofílica</b>				
<i>Methanosarcina bacterii</i>	37	7,4	65	metano
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	37	7,0	24	acetato, formato, metano
<b>Bactérias termofílicas</b>				
<i>Microcella thermoacetica</i>	55	6,5 - 6,8	10	acetato
<i>Carboxydocella pacificus</i>	70	6,8 - 7,1	7,1	H <sub>2</sub>
<i>Desulfotomaculum carboxidovorans</i>	60	6,8 - 7,0	12	H <sub>2</sub>
<b>Archaea termofílica</b>				
<i>Thermococcus fulgidus</i>	83	6,4	-	acetato, formato, H <sub>2</sub> S

O etanol é produzido pela síntese redutiva do acetil-CoA, que é a via de formação de ácidos orgânicos e álcoois.

A síntese se faz pela oxidação do H<sub>2</sub> para 2H<sup>+</sup> ou de CO com água para formar CO<sub>2</sub> e 2H<sup>+</sup> e produz a redução equivalente do CO<sub>2</sub> para formato (HCOOH), do metileno-tetrahydrofolato (CHTHF) para metenil-tetrahydrofolato (CH<sub>3</sub>-THF) e deste para metil-tetrahydrofolato e do CO<sub>2</sub> para CO.

A acetil CoA sintase/ CO desidrogenase catalisam a formação da acetil coenzima A do grupo metílico para a ligação do grupo CO e coenzima A.



**Figura 3** - Esquema do mecanismo bioquímico de biosíntese de álcoois partindo do gás de síntese.

Fonte: HENSTRA et al, 2007

### 3.2.3. Carvão

Carvão mineral é formado a partir do soterramento e decomposição de restos de material de origem vegetal. Estes materiais ao sofrerem soterramento e compactação em bacias de deposição apresentam enriquecimento no teor de carbono. Fatores como pressão, temperatura, movimentos tectônicos e tempo de exposição, determinam o grau de carbonificação deste combustível. Durante este período de formação a matéria orgânica sofre modificações onde existe perda de oxigênio e água, associado ao enriquecimento do carbono. Como é um combustível fóssil, apresenta os mesmos problemas do petróleo, não sendo um recurso renovável e produz poluentes desde a extração até a utilização (AMBIENTE BRASIL, 2006).

O carvão na realidade desempenha papel secundário no setor energético brasileiro, pois as reservas locais são ricas em enxofre e necessitam de processamentos antes de sua utilização na indústria siderúrgica (GOLDEMBERG, 1998).

Além da forma mineral o carvão pode ser obtido de biomassa vegetal por combustão incompleta. Partindo-se principalmente da madeira colocada sob condições de alta temperatura e pouco acesso ao oxigênio, onde ocorre a desidratação e carbonização da biomassa. No Brasil o carvão vegetal tem sido produzido pela queima de madeiras nativas e daquelas vindas de reflorestamento, sendo o *Eucalyptus* sp a planta de maior exploração. A qualidade do carvão vegetal está na dependência do tipo de biomassa. Por exemplo, o endocarpo de cocos, como o de *Obygnia* sp cuja estrutura é altamente lignificada gera carvão de qualidade semelhante ao de carvão mineral e pode ser aplicado em siderúrgicas (DOMINGOS, 2003)

#### **3.2.4. Biomassa**

A biomassa sob a forma de lenha, resíduos agrícolas ou lixo urbano são materiais passíveis de gerarem energia. Porém, o uso indiscriminado da lenha, que é queimada com baixos teores de oxigênio para a produção de carvão, contribuiu para a devastação de florestas nacionais. No caso, de utilização da biomassa com maior eficiência; pode-se, por exemplo, aplicar o processo de gaseificação e empregar gás para acionar turbinas para a geração de eletricidade (GOLDEMBERG, 1998).

A outra opção já relatada é a geração do gás de síntese em gaseificadores (SPIVEY, EGEBEBI, 2007).

O bagaço de cana resultante da produção de açúcar é utilizado em parte na obtenção de energia elétrica (EID, 1996). Este é um procedimento em expansão no Brasil.

A agroindústria canavieira pela queima do bagaço de cana tem um potencial de geração de energia estimado em 12mil MW. Esta energia no sudeste do Brasil pode ser utilizada justamente no período de inverno quando coincide com a época de menor pluviosidade estando as hidrelétricas com os reservatórios em seus níveis mais baixos (ORTEGA FILHO, 2003).

#### **3.2.5. Álcool – etanol**

Uma das vias de obtenção do etanol é mediante a síntese química a partir de derivados de petróleo como eteno e etino. No Brasil a produção de álcool é realizada mediante o processo de fermentação de substâncias amiláceas ou açucarada. Das substâncias açucaradas a cana de açúcar domina o mercado (AMORIN, 2005).

O cultivo da cana de açúcar é uma das mais antigas do Brasil. Data de 1502 a introdução das primeiras mudas no município de São Vicente no Estado de São Paulo. Esta cultura sempre esteve presente na economia brasileira desde o período do Brasil colônia onde o álcool era apenas um subproduto da produção de açúcar (ORTEGA FILHO, 2003)

O etanol desde a época dos bandeirantes no Brasil era utilizado como combustível. Conta a história que os índios ficavam impressionados com a possível queima de algo que parecia água.

Em 1925 o álcool fora experimentalmente empregado como combustível, mas em função da abundância e baixo custo da gasolina, o seu consumo ocorria em pequena escala. Este fato não estimulou a promoção de pesquisas e aperfeiçoamento no processo de sua produção e exploração (SILVA, 1997).

Em 1974, o mundo foi surpreendido por uma crise no fornecimento de petróleo. Nesta época o governo incentivou a produção do álcool para ser misturado à gasolina, criando o Programa denominado PROÁLCOOL. Este incentivo proporcionou ao Brasil grandes avanços tecnológicos na obtenção deste combustível, além de sua utilização em larga escala independente do mercado internacional de petróleo (ORTEGA FILHO, 2003).

Como combustível, o álcool tem a vantagem de ser uma fonte de energia renovável e menos poluidora que os derivados do petróleo (AMBIENTE BRASIL, 2006).

A produção de álcool incentiva a monocultura e de alguma forma favorece a concentração da renda e o esgotamento do solo. Para a produção de um litro de álcool são produzidos cerca de doze litros de vinhoto residual que ainda é distribuído, segundo normas da CETESB, no solo isto em função de ainda não existir uma melhor forma para sua aplicação. O descarte descontrolado pelas usinas geradoras da vinhaça cria possibilidade de contaminar o solo e lençóis freáticos (SILVA, 1997). Atualmente a CETESB (2006) criou novas normas para descarte.

Para a colheita da cana esta pode ser mecânica ou manual e frequentemente ocorre a queima das folhas no canavial. Isto visa facilitar o corte mecânico, mas, sobretudo o manual. A queima libera energia, gases como carbônico, ozônio, nitrogenados, muitos outros compostos e algumas pequenas parcelas de enxofre. Além disso, forma-se a indesejada fuligem, produto das folhas queimadas, que é arrastada pelas correntes aéreas atingindo grandes distâncias. A queima provoca perdas significativas de matéria orgânica, que poderia funcionar como nutriente para as plantas. A eliminação das folhas pela queimada facilita o aparecimento de ervas daninhas e a erosão, devido a queima de matéria orgânica do solo, induzindo a diminuição da e sua proteção (AMBIENTE BRASIL, 2006).

A indústria sucroalcooleira conseguiu avanços para solucionar problemas, como a possibilidade do corte da cana de forma mecanizada, o que pode eliminar as queimadas, mas ainda o que se observa é a colheita mecânica mesmo onde a cana foi queimada. A mecanização propiciou mais estabilidade de emprego anual, porém diminuiu o número de empregados que anteriormente eram utilizados apenas nos períodos de safra (EID, 1996).

O etanol produzido atualmente no Brasil na safra de 2008/2009 deve atingir 22 bilhões de litros. A maior parte é utilizada para abastecer a frota automobilística nacional como mistura de 22% na gasolina e os carros movidos exclusivamente por álcool.

Contudo, o etanol deve ser visto como matéria prima podendo ser empregado na alcoolquímica mediante inúmeras reações. Uma das possibilidades de utilização do álcool refere-se a produção do biodiesel mediante as reações de transesterificação onde reage com os triglicerídeos para a produção do biodiesel.

### 3.2.6. Biodiesel

Biodiesel é o nome de um combustível derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, usado em motores de ciclo diesel. O maior incentivo de sua produção é a possibilidade de substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil. Esta reação é a transesterificação dos triglicerídeos, onde libera a glicerina e os ácidos graxos são esterificados com metanol ou etanol (VEDANA, 2006).

Em 1900 na exposição de Paris a empresa OTTO apresentou motores que foram movidos a óleo de amendoim. Os óleos vegetais e gorduras animais eram alternativos como combustíveis antes da década de 80. Rudolf Diesel (1858-1913) que inventou o motor “diesel” apresentava interesse neste combustível.

Outros experimentos com óleos de mamona e gorduras animais foram realizados em São Petersburgo para movimentar locomotivas. Rudolf Diesel previu no final de sua vida que **“a energia dos motores poderá ser produzida com o calor do sol, que sempre estará disponível para fins agrícolas, mesmo quando novas fontes de combustíveis sólidos ou líquidos estiverem exauridos”** (KNOTHE, 2006).

Nos tempos atuais o biodiesel pode ser produzido a partir de muitas matérias-primas especialmente vegetais cultivadas em diferentes latitudes. Como referência pode-se citar a soja produzida em grande escala nos Estados Unidos e no Brasil, a canola na Europa, em áreas tropicais os óleos das palmeiras, caroço do algodão, amendoim, mamona, milho, gergelim e outros.

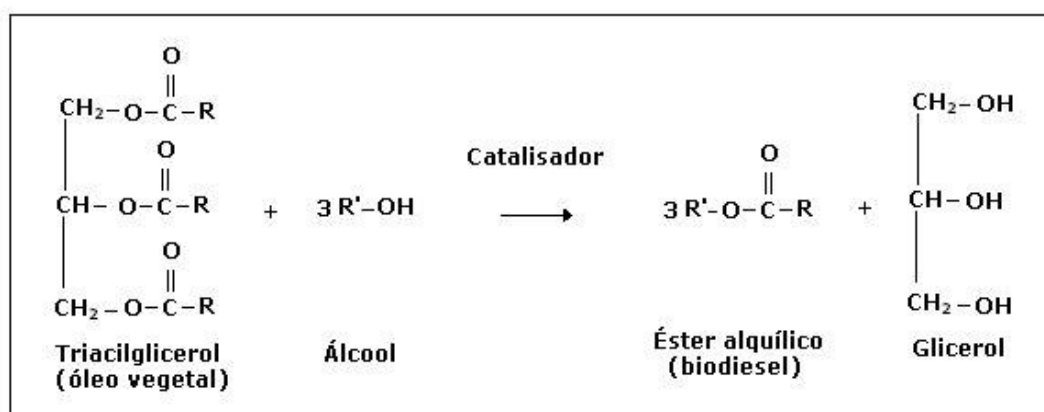
Data de 1942 é a primeira citação da aplicação de biodiesel encontrada na literatura descrita por G. Chavanne (Universidade de Bruxelas, Bélgica). O pesquisador descreveu que a produção dos ésteres metílicos obtidos por transesterificação em meio ácido, atualmente emprega-se a catálise alcalina. O produto obtido por Chavanne foi usado em ônibus urbano movido a biodiesel em Bruxelas.

O termo “biodiesel” aparece na literatura mediante a publicação de um resumo atribuído ao pesquisador chinês Wang, R. (Development of Biodiesel Fuel. Chem. Abstr. 111:26233, 1988 *in* KNOTHE, 2006).

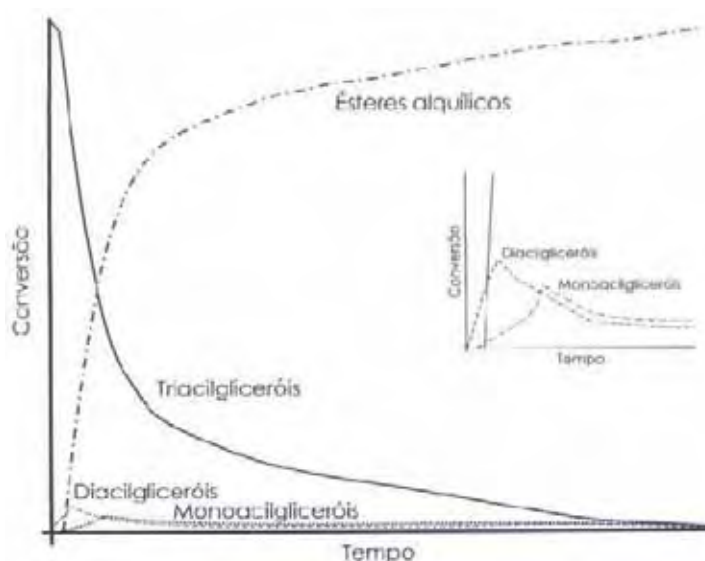
Na fabricação de biodiesel podem-se empregar álcoois de baixa massa molar e geralmente o mais barato, por exemplo, nos Estados Unidos o metanol é mais utilizado e no Brasil o etanol é que apresenta maior vantagem na produção; dependendo do tipo de álcool utilizado os produtos da transesterificação são muitas vezes denominados de ésteres metílicos ou etílicos ao invés de biodiesel (GERPEN, KNOTHE, 2006).

A transesterificação pode ser realizada por catálise ácida ou básica, porém os catalisadores alcalinos proporcionam maior rapidez ao processo. Outros parâmetros são analisados, como a razão molar entre álcool e o óleo empregado, a temperatura o grau de refino do óleo e a presença de umidade e de ácidos graxos livres (AGL) (GERPEN, KNOTHE, 2006).

A equação geral de produção de biodiesel pode ser escrita de maneira simplificada como segue:



O gráfico abaixo demonstra qualitativamente a relação entre conversão e tempo de reação onde o di- e monoacilgliceróis são formados como intermediários durante a transesterificação. Enquanto os triacilgliceróis diminuem há a formação de ésteres alquílicos com o tempo há uma pequena liberação de di- e monoacilgliceróis. Os aspectos quantitativos e a escala da figura podem variar de reação para reação (GERPEN e KNOTHE, 2006).



**Figura 4:** Gráfico qualitativo de conversão em uma reação progressiva de transesterificação.

A reação de transesterificação pode apresentar variações devido à presença de água e de ácidos graxos livres (AGL). A presença de umidade na reação provoca a hidrólise dos ésteres sintetizados a ácidos graxos livres como visto na reação a seguir:



Esta umidade pode ser provocada pelo fato dos catalisadores serem higroscópicos, o que leva a necessidade de tratamento com nitrogênio, evitando assim o contato com a umidade do ar. Soluções de alcóxidos apresentam a vantagem sobre os hidróxidos, pois não há a formação de água que resulta em maior pureza no final da reação (GERPEN e KNOTHE, 2006).

O biodiesel é fabricado mediante o processo chamado transesterificação onde a glicerina é separada da gordura ou do óleo vegetal na forma de ácidos graxos que reage com o álcool. O processo gera dois produtos, ésteres (o biodiesel) e glicerina. O biodiesel de qualidade deve ser produzido seguindo especificações industriais restritas, a nível internacional tem-se a ASTM D 6751. Nos EUA, o biodiesel é o único combustível alternativo a obter completa aprovação no “Clean Air Act” de 1990 e autorizado pela Agência Ambiental Americana (EPA) para venda e distribuição. Mundialmente mediante uma nomenclatura apropriada identifica-se a porcentagem em volume do biodiesel à mistura, ou seja, o B2 apresenta 2% e o B100 apresenta 100% de biodiesel acrescido de óleo diesel vindo do petróleo. O biodiesel é perfeitamente miscível com gasolina, tem características físicas e químicas semelhantes ao óleo diesel mineral. Além disso, pode ser usado em motores do ciclo diesel sem adaptações (VEDANA, 2006).

“Se utilizado puro, o biodiesel reduz em até 68% as emissões de gás carbônico, em 90% as de particulado, e elimina as emissões de óxido de enxofre. Por ser biodegradável, atóxico e

praticamente livre de compostos de enxofre e substâncias aromáticas, é considerado um combustível ecológico” (AGÊNCIA CÂMARA DE NOTÍCIAS, 2006).

A princípio a transesterificação é reversível, porém como o glicerol não é miscível no biodiesel há a formação de duas fases que não permite que a reação reversa ocorra ou que seja consideravelmente negligenciável. A adição de co-solventes na reação acelera significativamente a velocidade da reação aumentando a solubilidade do metanol no óleo vegetal, porém a manipulação da maioria destes co-solventes, como tetrahidrofurano (THF) e metil *terc*-butil éter (MTBE), é perigosa e insalubre (GERPEN, KNOTHE, 2006).

Na USP, Campus de Ribeirão Preto foi anunciada a produção de biodiesel utilizando etanol onde a glicerina e o biodiesel são obtidos separados. Este processo emprega catalisadores a base de argila e radiação eletromagnética cuja produção é 30 vezes o volume se comparado com uma planta industrial européia (LIMA, 2004).

A tabela 1 insere dados relativos a culturas, fontes, percentual de lipídeos, produção e custo das matérias-primas para produção de biodiesel.

**Tabela 1** – Dados sobre produção, extração e custos do biodiesel a partir de diferentes matérias-primas.

Cultura oleaginosa	Origem do óleo	Extração óleo (%)	Colheita (meses)	Óleo/hectare (toneladas)	Custo estimado (R\$)
Dendê	Noz	22,0-26,0	12	3,0-6,0	1,05 (1)
Coco	Fruta	55,0-60,0	12	1,3-1,9	1,94 (1)
Babaçu	Grão	66,0	12	0,1-0,8	1,62 (1)
Girassol	Grão	38,0-48,0	3	0,5-1,9	0,87 (1); 1,35 (2)
Colza/canola	Grão	40,0-48,0	3	0,5-1,0	1,43 (1)
Mamona	Grão	43,0-50,0	3	0,6-0,8	1,46(2) 1,33 (3)
Amendoim	Grão	40,0-50,0	3	0,2-0,8	1,87 (1)
Soja	Grão	17,0-18,0	3	0,2-0,6	1,11 (1)
Algodão	Grão	15,0	3	0,1-0,2	0,71 (1)

Fonte: Anae, 2006, apud GARCEZ, 2008

Fonte pelos custos: (1) SLUZZ e MACHADO, 2006; ABREAU e GUERRA, 2006; (2) NAE, 2006, apud GARCEZ (2008)

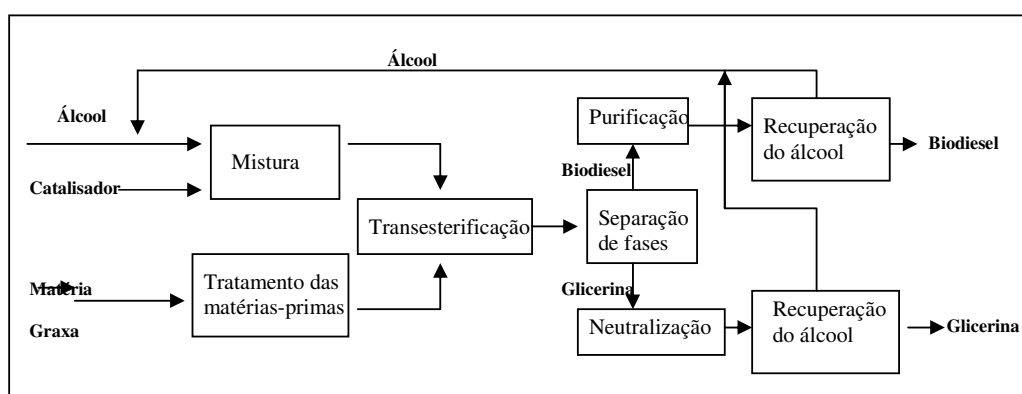
A partir da divulgação da possibilidade de se introduzir um novo combustível a indústria mobilizou-se e novas perspectivas surgiram para sua produção.

Para obter-se o biodiesel são necessárias três etapas:

- Pré-tratamento das matérias primas; considerando-se o óleo, procede-se primeiro a sua extração. Nesta fase os óleos sofrem a remoção de goma, dos ácidos graxos livres, a desodorização e a descoloração.
- Transesterificação é onde ocorre a reação entre o lipídeo e o álcool com a produção de éster (biodiesel) e glicerol. Neste processo utilizam-se catalisadores ácidos ou básicos, sendo o último

o mais atraente por acelerar mais rapidamente o processo e ser menos corrosivo que a catálise ácida, embora apresente o inconveniente de produzir água, hidrolisar alguns ésteres e saponificar alguns ácidos graxos livres.

- Purificação do biodiesel após a transesterificação, além dos ésteres, pode existir triglicerídeos que não reagiram, álcool, catalisador, mono e diglicerídeos, sabão e glicerol, que necessitam serem removidos. Os dois principais produtos são os ésteres e o glicerol, que apresentam densidades diferentes, sendo os ésteres constituintes da fase mais leve e o glicerol da fase mais pesada. Desta forma, para sua separação podem-se aplicar métodos de separação como decantação ou centrifugação. O trabalho é facilitado uma vez que o glicerol incorpora a maior parte dos subprodutos. A última etapa é a lavagem dos ésteres para remover algum resquício de contaminantes seguindo-se a secagem e o armazenamento. Algumas empresas promovem a destilação do biodiesel para a obtenção do produto com maior pureza (FELIZARDO, 2003), (Figura. 5).



**Figura 5** – Processo tecnológico geral de produção do Biodiesel

Fonte: FELIZARDO, 2003.

Ainda há etapas que diminuem o custo pela recuperação e reutilização do álcool e a possível comercialização da glicerina, explicados a seguir:

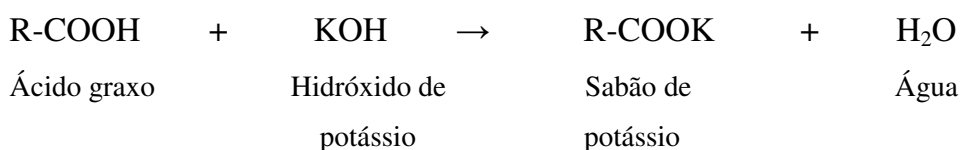
- Recuperação do álcool - a fase pesada, contendo água e álcool, é submetida a um processo de evaporação, eliminando-se da glicerina bruta esses constituintes voláteis, cujos vapores são liquefeitos num condensador apropriado. Da mesma forma, mas separadamente, o álcool residual é recuperado da fase mais leve, liberando para as etapas seguintes, os ésteres metílicos ou etílicos.
- Destilação da glicerina - a glicerina bruta emergente do processo, mesmo com suas impurezas convencionais, já constitui o subproduto vendável. No entanto, o mercado é muito mais favorável à comercialização da glicerina purificada. A purificação da glicerina bruta é feita por

destilação a vácuo, resultando um produto límpido e transparente, denominado comercialmente de glicerina destilada (GUIMARÃES, 2008).

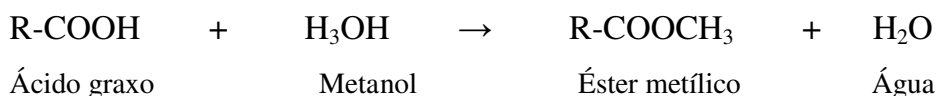
Se o óleo ou gordura apresentam quantidades significativas de AGL devem passar por um:

- Pré-tratamento catalisado por ácidos - que converte o AGL em éster metílico que posteriormente será transesterificado com um catalisador alcalino.

Quando há muito AGL nos óleos, há uma reação desses com os catalisadores alcalinos formando sabão e água como na reação abaixo:



A utilização de catalisador ácido nas situações em que há mais que 5% de AGL no óleo utilizado evita a emulsificação entre glicerol e os ésteres metílicos (GERPEN, KNOTHE, 2006).



Utilizando metanol a reação mantida a 32°C atinge um rendimento de 99% em quatro horas, se a temperatura for  $\geq$  a 60°C empregando óleos vegetais refinados na razão molar álcool: óleo de pelo menos 6:1 a reação ocorre em uma hora, para a utilização de etanol a temperatura deve ser de 75°C e para butanol deve ser de 114°C (GERPEN, KNOTHE, 2006).

No processo da produção do biodiesel utiliza-se preferencialmente o metanol, derivado do petróleo, devido às facilidades cinéticas que proporciona alta reatividade. O uso do metanol está na dependência do petróleo, além disto, o Brasil é um dos maiores produtores de álcool etílico, isto estimula estudos para seu uso em substituição ao metanol (LIMA et al, 2007).

Podem ser utilizados como catalisadores tanto o hidróxido de sódio (NaOH) quanto o hidróxido de potássio (KOH), usados em diminutas proporções. A diferença entre eles, com respeito aos resultados na reação, é muito pequena. No Brasil o hidróxido de sódio tem menor custo que o hidróxido de potássio (GUIMARÃES, 2008).

Na transesterificação de sebo bovino o emprego de NaOH apresenta maior eficiência que os alcóxidos. Há a necessidade de agitação para que cause formação de gotículas de NaOH/metanol para aumentar a velocidade da reação uma vez que há imiscibilidade de NaOH/metanol em sebo bovino. O etanol apresentou vantagem neste processo por ser solúvel em sebo bovino, causando maior rendimento que deve prevalecer em outros tipos de matérias (GERPEN e KNOTHE, 2006).

O uso do biodiesel como combustível apresenta segundo o GOVERNO DA BAHIA, (2006) e KNOTHE, (2006) algumas vantagens:

- É uma energia renovável;
- Utiliza fontes alternativas (óleos vegetais e gorduras animais);
- Propicia a redução das importações do diesel de petróleo;
- Propicia a redução das emissões de gases poluentes;
- Adapta-se facilmente aos motores ciclo diesel;
- Apresenta a possibilidade da utilização de seus co-produtos (torta e glicerina) com perspectivas para novos mercados;
- O biodiesel produzido no Brasil tem grande potencial de exportação;
- Funciona como lubrificante e pode aumentar a vida útil do motor;
- O transporte e o armazenamento são mais fáceis e mais seguros, devido ao seu menor risco de explosão;
- Nas culturas das plantas oleaginosas o agricultor poderá fazer rotação de culturas propiciando melhores ganhos econômicos e melhor aproveitamento e conservação do solo;
- Trata-se de um produto miscível com o óleo diesel em qualquer percentual;
- O consumo de oxigênio menor que a do óleo diesel;
- Os investimentos em pesquisa são menos onerosos e podem melhorar a empregabilidade e fixação do homem no campo;
- Há a possibilidade do aproveitamento da glicerina para produção de biomassa microbiana ou outros álcoois;
- O biodiesel não apresenta compostos aromáticos e sulfurosos, considerados poluentes com certo grau de toxicidade.

Como toda indústria emergente é necessária cautela para não comprometer ainda mais o solo, e a estrutura agrícola já estabelecida, induzindo grandes seqüelas como:

- O excesso de incentivo à monocultura para a produção do biocombustível;
- Outro aspecto a ser considerado é que ainda não se tem estudos que possam subsidiar perspectivas em casos de:
  - Derrames acidentais do biodiesel durante o transporte que pode afetar a vida no ambiente terrestre e aquático;
  - Os grandes volumes de glicerina gerados só poderão ter mercado a preços muito inferiores aos atuais; todo o mercado dependente de insumos químicos poderá ser afetado.

### 3.2.5.1. Matérias primas produtores de biodiesel.

Na atualidade são conhecidas mais de 350 espécies de plantas oleaginosas das quais se podem extrair os óleos, porém nem todos são utilizados como complemento alimentar. No mundo toda a produção estimada em óleos vegetais foi em 2002/2003 de 80,64 milhões de toneladas. Deste total a maior parte é consumida como complemento alimentar, sendo que parte é perdida. Após utilização dos óleos, parcela deles é descartada na rede de esgoto, aterros sanitários ou incinerada. Quanto aos óleos residuais considerando-se os custos das matérias-primas, somadas os problemas ambientais que são gerados e o melhor entendimento dos recursos naturais busca-se intensamente formas para seu reaproveitamento. Com a possibilidade de melhor utilização e reutilização das substâncias oleaginosas deverá ocorrer diminuição da contaminação de águas, solos minimização da carga orgânica que atinge os aterros sanitários.

Alguns experimentos indicaram a possibilidade da utilização direta do óleo nos motores, porém são necessários nestas máquinas ajustes ou o aquecimento dos óleos para evitar o encrustamento de resíduos internamente nos cilindros. A transformação dos óleos in natura em biodiesel é a solução para minimizar completamente este tipo de problema (MURIAPPA et al, 1996).

No Brasil o biodiesel como está sendo produzido, tem como principais matérias primas para sua geração os óleos extraídos das seguintes plantas:

#### **Amendoim.**

O amendoim (*Arachis hypogaea*) é planta originária da América do Sul, da região compreendida do Gran Chaco (Paraguai), incluindo as bacias dos Rios Paraná e Paraguai. A difusão do amendoim iniciou-se pelos indígenas para as diversas regiões da América Latina, América Central e México. No século XVIII foi introduzido na Europa. No século XIX difundiu-se do Brasil para a África e do Peru para as Filipinas, China, Japão e Índia. O amendoim foi a primeira matéria prima para a produção de biodiesel no mundo, em 1898. No Brasil, 88,6% da produção nacional de amendoim ocorre na região Sudeste; 8,3% do total é produzido na região Sul; e 2,9% na região Nordeste. A soja, o algodão e a colza são as culturas oleaginosas no mundo de maior expressão econômica, sendo que o amendoim ocupa a quarta colocação. Os maiores produtores mundiais de amendoim na safra 2002 foram: a China; a Índia; os Estados Unidos; a Nigéria; a Indonésia; Senegal; o Brasil ocupa 13º lugar nesta produção (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2006).

Como todas as matérias graxas de origem vegetal, o óleo de amendoim é constituído principalmente por triglicerídeos e diversos componentes menores, tais como fosfatídeos, glicolipídeos, ácidos graxos livres, tocoferóis, esteróis, pigmentos, corantes e outros (SCHUSTER, 2006).

## Soja

A soja (*Glycine max*) é originária do Nordeste da China. A mais antiga referência sobre soja na literatura foi escrita em um livro de medicina intitulado "Pen Ts'ao Kang Mu" (Matéria Médica), escrito pelo Imperador Shen Nung. Esta consta como a primeira publicação no ano de 2.838 AC. Embora esta referência seja antiga, a domesticação e cultivo da soja parecem ser mais recentes, situando-se no século XI AC, durante a dinastia Shang (1.500-1.027 AC). A soja expandiu-se de maneira lenta para o Sul da China, Coréia, Japão e Sudeste da Ásia. Pelo fato da agricultura chinesa, na época, ser muito restritiva, a soja chegou à Coréia e desta ao Japão entre 200 AC e o século III DC (SUÍNO, 2006).

Atualmente os maiores produtores mundiais de soja são: Brasil, Estados Unidos, China e Argentina. O Brasil é o maior exportador mundial de soja e a produtividade média de 2.200 quilos por hectare, mas, nas principais regiões produtoras, ultrapassa 3.000 quilos por hectare (fonte CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento). Embora a soja tenha surgido na China, hoje em função de sua elevada população e industrialização é o país que mais importa esta leguminosa objetivando principalmente a alimentação humana, como suprimento energético e protéico.

No Brasil, geograficamente o Centro-Oeste é responsável por quase 50% da produção nacional de soja. No que se refere à capacidade industrial de processamento, o Estado do Paraná detém a liderança com 24% da capacidade, seguido pelo Mato Grosso (16%), Rio Grande do Sul (15%), Goiás (13%) e São Paulo (11%).

A estimativa da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE) é que em aproximadamente dez anos o Brasil esteja produzindo aproximadamente 105 milhões de toneladas de soja. Esse aumento de 70% na produção seria acompanhado de uma expansão de 35% na área plantada devido os ganhos em melhor produtividade resultante dos tratos culturais aos quais aplica-se tecnologia mais adequadas são previstos aumentos em 1,5% ao ano.

Na tabela 2, estão inseridos valores médios dos principais ácidos graxos encontrados em amendoim e soja.

**Tabela 2** - Composição dos principais ácidos Graxos do óleo das Leguminosas; amendoim, soja.

Leguminosas	Porcentagem de ácidos graxos				
	Palmítico	Esteárico	Oléico	Linoléico	Linolénico
	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3
Amendoim	11,2	3,2	51,6	26,0	-
Soja	11,0	3,9	22,0	53,5	7,5

Fonte: SCHUSTER, 2006

### **Dendê**

O dendê (*Elaeis guineensis*) foi introduzido na Malásia como uma planta ornamental, no início do século XX, e somente plantada comercialmente pela primeira vez em 1917, dando origem à indústria de óleo de palma da Malásia. No Brasil, chamada de “palmeira do dendê”, foi introduzida pelos escravos no século XVI. Para a extração do óleo, os frutos são cozidos a cerca de 135°C sob pressão de 2 a 3 atm., por aproximadamente uma hora. Depois de cozidos os frutos passam pelo debulhador, onde são separados dos cachos. Os frutos são prensados mecanicamente por prensa contínua para a retirada do óleo do mesocarpo. O óleo bruto obtido na prensagem é filtrado, onde são retiradas as partículas pesadas, depois é clarificado e purificado para a remoção de umidade e outras impurezas. O óleo bruto é transferido para o tanque de decantação onde ocorre a separação do óleo e da borra. O óleo é transferido para o tanque de armazenagem. A borra é processada na centrífuga e transferida para o decantador secundário, onde após separação do óleo é transferida para lagoas. Todo o óleo separado da borra volta para o tanque de decantação. As áreas agrícolas produtoras no Brasil encontram-se no Pará, Amazonas, Amapá e Bahia. Porém, os cultivos intensivos ocorrem principalmente no estado do Pará sendo o maior produtor deste óleo no Brasil. Os fatores climáticos da região onde ocorre maior incidência de energia solar, estabilidade da temperatura e umidade atmosférica (distribuição das chuvas). A estabilidade das condições atmosféricas é que produz maior repercussão na produtividade do dendê desta região (ABOISSA, 2006).

De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO), a produção nacional em 2004, foi de aproximadamente 550 mil toneladas, sendo que em 2003 o Brasil importou aproximadamente 24.375 toneladas deste óleo. Estes dados comprovam que a produção nacional de óleo de dendê é insuficiente para a demanda existente no mercado interno. Assim, tem-se que para a utilização do dendê para fins de produção de biodiesel há necessidade de muito investimento. Faz-se necessário aumento da área cultivada com dendê para que exista matéria-prima suficiente para abastecer as indústrias inclusive a de produção do biodiesel. Considerando-se que o dendezeiro é uma planta perene e a produção significativa inicia-se a partir do terceiro ano, de imediato não será possível aumentar o necessário à produção pois isto só será possível a médio prazo (AMORIM, 2005).

### **Babaçu**

Cada palmeira de babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart) pode apresentar até 6 cachos, contendo até 300 cocos por cacho. Frutos ovais alongados, de coloração castanha, em cachos pêndulos. A polpa é dura, envolvendo de 3 a 6 sementes oleaginosas. Cresce espontaneamente nas

matas da região amazônica, sem cultivo, multiplica-se por sementes. Cada palmeira pode produzir até 2.000 frutos anualmente, preferindo clima quente. O principal destinatário das amêndoas do babaçu são as indústrias de esmagamento, produtoras de óleo bruto e refinado (AMORIM, 2005).

O óleo das amêndoas do babaçu tem muitas finalidades aplicativas nas áreas de alimentação, farmacêutica e como componente de cosméticos.

Dada a complexidade para extração das amêndoas e do próprio óleo do babaçu, sua obtenção em larga escala torna-se complexa (DOMINGOS, 2003).

A tabela 3 indica a composição média do óleo das palmeiras dendê e babaçu.

**Tabela 3** – Composição química dos principais ácidos graxos dos óleos de Palmeiras de *Elaeis guineensis* (dendê) e *Orbignya phalerata* (babaçu).

Palmeira	Porcentagem de Ácido Graxo						
	Láurico C 12:0	Mirístico C 14:0	Palmítico C 16:0	Esteárico C 18:0	Oléico C 18:1	Linoléico C 18:2	Linolénico C 18:3
Dendê	-	-	44	2	40	9	<1
Babaçu	47	19	9	5	15	4	-

Fonte: AMORIM, 2005.

### Mamona

A mamona (*Ricinus communis* L.), é uma planta explorada há longo tempo no Brasil, em função principalmente do óleo contido em suas sementes. Seu óleo, também conhecido como óleo de rícino, presta-se como matéria prima para numerosas aplicações, nas áreas de: química têxtil, papéis, plásticos e borrachas, perfumaria, cosméticos, farmácia, eletroeletrônicos e telecomunicações, tintas e adesivos, lubrificantes, na aeronáutica e outras áreas. O óleo de mamona também é empregado em vários processos industriais, como a fabricação de corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes para serem utilizados a baixas temperaturas, colas, aderentes, base para fungicidas e inseticidas, tintas de impressão e vernizes, além de nylon e matéria plástica (CHIARICE e CLARO NETO, 2001; BERTOLLETTI et al; 2007, MESSETTI et al; 2007).

Da industrialização da mamona obtém-se, como produto principal, o óleo e, como subproduto, a torta, que possui, enquanto fertilizante, a capacidade de restauração da fertilidade de solos esgotados. A torta possui alto teor de proteínas (32 a 40%), porém, apresenta-se muito tóxica e somente pode-se destinar à alimentação animal após ser submetida a um processo complexo e oneroso de desintoxicação. Por esse motivo, muitas empresas preferem vender a torta apenas como fertilizante. A produção nacional de mamona ao longo dos anos vem sofrendo flutuações acentuadas, mesmo quando o Brasil era o maior produtor e exportador mundial de derivados da mamona nas décadas de 60 e 70 e 80, a produção não era estável. Porém, há uma tendência de

estabilização ou crescimento com a possibilidade do óleo ser industrializado transformando-se em biodiesel e ser introduzido na matriz energética brasileira. Esta nova possibilidade deverá trazer novos investimentos, tecnologias agrícolas e industriais para o setor produtivo e uma oferta econômica mais estável (AMORIM, 2005).

Durante o processamento, as sementes de mamona passam pela higienização e seguem para o aquecimento em vários estágios. O óleo obtido mediante aplicação de prensa mecânica é aquecido em cubas de água ou vapor direto, para ser hidratado na base de 45% de umidade. Com auxílio de água quente e centrífuga o óleo é separado e a seguir filtrado. Nesta operação separa-se a borra que é misturada à torta que será submetida à extração por solvente, de onde se obtém o óleo final e o farelo. O óleo obtido da prensagem é clarificado, desidratado, purificado e a seguir é misturado com o óleo proveniente da extração por solvente. Sua composição em ácidos graxos está relacionada na tabela 4.

**Tabela 4** - Composição dos principais ácidos graxos do óleo de rícino

Percentual de ácidos graxos do óleo rícino							
Palmítico	Esteárico	Dihidro- xiesteárico	Oléico	Linoléico	Linolênico	Behênico	Ricinoléico
C16:0	C18:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C22:0	19:1
01-02	0,9 - 02	1	2,9 - 06	03-05	0 - 0,5	2,1	88

Fonte: CAMPESTRE, 2006.

### Óleos e gorduras animais

Os animais apresentam diferentes tipos de gorduras. Dentre elas genericamente o termo “sebo” é utilizado para denominar gordura animal. Entretanto, pode-se destacar dentro desta categoria o sebo propriamente dito e os triglicerídios (graxas). Basicamente as diferenças entre os dois é o ponto de fusão, a acidez dos seus ácidos graxos. Todas as gorduras comestíveis são substâncias constituídas por misturas de triglicerídeos contendo quantidades variáveis de outras substâncias que podem fazer parte da natureza do produto ou se formarem durante o processamento. Uma vez que, todos os óleos e gorduras são ésteres de ácidos graxos e glicerol a diferença entre estes compostos se deve, exclusivamente à natureza dos ácidos graxos os quais estão ligados ao glicerol. Os lipídeos quando aquecidos com soluções alcalinas são parcialmente hidrolisados (saponificados) sendo separado em duas frações: saponificável e insaponificável. A fração saponificável e a insaponificável são compostas respectivamente de sais dos ácidos graxos e a outra esteróis, álcoois, hidrocarbonetos e vitaminas lipossolúveis (BOBBIO, 1985).

Abreu (2005) enumerou como vantagens da utilização de resíduos de abates de animais a disponibilidade imediata, baixo custo e a grande diversidade de matéria prima, o que viabiliza um biocombustível mais compatível.

Em 2007 a Fertibom utilizou o sebo bovino na produção do biodiesel por ser mais vantajoso economicamente, uma vez que o preço por quilo oscilava custava entre R\$ 1,05 e R\$ 1,10. Industrialmente cada quilo produz aproximadamente a mesma quantidade de biodiesel (ROCHA, 2008).

Visando fomentar a produção de biodiesel a partir do sebo bovino, o governo de Mato Grosso, por meio da Secretaria de Estado de Fazenda (Sefaz/MT), reduziu a zero a base de cálculo do Imposto Sobre Circulação de Mercadorias e Serviços (ICMS) nas operações de saídas internas de sebo com destino a estabelecimentos produtores de biodiesel, uma vez que a maior parte deste combustível é obtida utilizando-se grão e oleaginosas. Porém este diferimento vale somente para operações realizadas dentro do Estado. Para as interestaduais, a tributação é normal (GOVERNO DO MATO GROSSO, 2008).

Os pecuaristas brasileiros poderão beneficiar-se diretamente do crescimento previsto para o mercado de biodiesel nos próximos anos, fornecendo matéria-prima fundamental para que o país consiga a exportar o biocombustível para a Europa. Segundo o secretário de Produção e Agroenergia do Ministério da Agricultura, Linneu Costa Lima somente com o uso do sebo bovino o Brasil poderá obter biodiesel de composição semelhante ao utilizado na Europa. O biodiesel a partir do sebo bovino teria como vantagens comparativas o baixo custo no mercado interno e o fato de ser um subproduto da carne em um país que tem o maior rebanho comercial do mundo, com 200 milhões de cabeças (ROCHA, 2008).

A produção estimada no Brasil de sebo bovino, de graxa suína e de óleo de aves é de 1.560.000 de 355.000 é de 218.000 ton/ano (Bellaver, 2005 apud ABREU, 2005).

Os sebos de suínos e de bovinos são bastante valorizados na produção de embutidos, cosméticos e produtos de limpeza, portanto é mais viável produzir energia com a gordura de frango nos pólos produtores de aves (NETO, 2008).

As gorduras animais são geralmente classificadas como sebos, gorduras que apresentam estado sólido em temperatura ambiente, devido a sua composição percentual ser elevada em ácidos graxos saturados, principalmente o esteárico. Faz exceção às gorduras de aves, classificada como óleo de frango, devido também a sua composição percentual, neste caso com valores baixos de ácido esteárico, ficando próximas a óleos como o de soja, apresentando-se em estado líquido a temperatura ambiente, facilitando a reação de transesterificação. Sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais de carne de frango há a oportunidade de aproveitar gorduras provenientes

desta cadeia produtiva, óleo não comestível de vísceras de frangos para uso como combustíveis (BIODIESELBR, 2008).

Teixeira (2005) afirma que a produção com vísceras de aves se apresenta promissor, porém novos estudos são necessários.

Comparando o biodiesel bovino com o de soja e os dois apresentam semelhanças quanto a liberação de hidrocarbonetos, monóxido de carbono e particulados, ainda há a vantagem do biodiesel bovino por apresentar maior estabilidade a oxidação, lubricidade e número de cetano; como ponto negativo há o maior entupimento de filtros a frio (HILBER, 2005 apud TEIXEIRA, 2005).

As gorduras dos animais vivos usualmente são incolores e são quimicamente formadas de triglicerídios. A partir do momento do abate, tem início a decomposição. Com a morte do animal pela ação de enzimas e de bactérias tem início mudanças tanto na cor como no teor de Ácidos Graxos Livres. Deste modo, o controle enzimático e bacteriológico antes do abate é fator essencial para obtenção de gorduras de qualidade. Para a preservação da qualidade do sebo seria necessário o uso dos melhores e mais modernos processos para abate, separando a gordura da proteína sólida e a água contida no material residual finalizando com estocagem adequada. O processo de manuseio técnico é a premissa para produzir e manter a qualidade das gorduras.

Os resíduos gordurosos que procedem do local de abate são atualmente industrializados. Tais materiais são enviados a uma sala de preparo onde são manipulados como subprodutos do processo. Esta sala é dotada de um ou mais trituradores de ossos e resíduos, que promovem a homogeneização do material. A mistura assim preparada é submetida ao aquecimento em digestores e atinge 120°C, sob pressão. Após o término do cozimento, a câmara é despressurizada e promove-se a descarga. O sebo separado no cozimento é acumulado em reservatório aquecido por serpentinas, sob o percolador (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2006).

**Tabela 5** - Composição média de gorduras denominadas sebos

Origem das Gorduras	Porcentagem de Ácido Graxo				
	Mirístico C 14:0	Palmítico C 16:0	Esteárico C 18:0	Oléico C 18:1	Linoléico C 18:2
Banha (Suíno)	-	24,6	15,0	50,4	10,0
Sebo Ovino	2,0	27,2	25,0	43,1	2,7
Sebo Bovino	2,0	29,0	24,5	44,5	-

Fonte: ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2006.

Uma pesquisa realizada em Santa Catarina avaliou a utilização de gorduras animais para a produção de biodiesel. Segundo a literatura, o teor de ácidos graxos livres nas gorduras deve ser inferior a 3% para que ocorra uma conversão completa na produção do biodiesel, pois a presença de ácidos graxos livres durante a reação de transesterificação pode reagir com o catalisador alcalino, formando produtos de saponificação. Quando analisado os resultados obtidos em cada gordura foram: suína 1,16%, bovina 2,63%, de ave 10,06%; indicando uma melhor utilização que as gorduras de suínos e de bovinos podem apresentar para conversão em biodiesel. Além disso, chegou às razões molares gordura-etanol de 1:5-1:7 que apresentaram os melhores rendimentos. Isto ocorre porque em baixas concentrações de etanol a reação é reversível. Por outro lado, em concentrações elevadas de etanol (acima de 1:8) ocorre a hidrólise da gordura, com formação de ácido graxo, diminuindo o rendimento da reação (JOÃO, 2007).

Há também o biodiesel produzido a partir de gorduras animais pelos estudantes da Escola de Bodoquena, da Fundação Bradesco, em Miranda, Mato Grosso do Sul, irá passar por análises de 17 parâmetros físico-químicos. As amostras são de gordura de frango e de suíno. Esse biodiesel abastece dois tratores e ainda um motor estacionário utilizado para bombear água da irrigação. Com a análise será possível saber se o biodiesel produzido pelos alunos está dentro das normas técnicas exigidas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP). Eles já realizaram testes com abastecimento de 100% de biodiesel, e a operação está dentro do desejado. Esta experiência é uma forma de aproveitar os resíduos do abate de suínos e aves na escola, que antes eram destinados ao um aterro ou utilizados em compostagem (D'AVILA, 2008).

### **Microrganismos**

A Empresa Oil Fox da Argentina assinou uma carta de intenções com o governo da província de Chubut para semear em piscinas gigantes quatro variedades de algas com a finalidade de produzir óleo, como uma alternativa à soja. A empresa baseia-se numa pesquisa do Massachusetts Institute of Technology (MIT). No Japão, há pesquisas afirmando que um hectare de soja produz quatrocentos litros de óleo e na mesma área de alga produz maior quantidade de óleo (KIDD, 2007).

As microalgas têm sido propostas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis. Em relação aos vegetais superiores, as microalgas apresentam várias vantagens, tais como maior eficiência fotossintética, rápido crescimento, maior produção de biomassa por área, a produção não segue regime de safras, sendo a coleta diária, cultivo em condições climatológicas e pedológicas não adequadas às culturas tradicionais, utilização de áreas desérticas, com baixo valor econômico para outros usos. No cultivo de microalgas pode ser usada água do mar, águas salobras e, como

fontes de carbono, resíduos industriais, como por exemplo, efluentes orgânicos e CO<sub>2</sub>, sendo a captação deste último, pelas microalgas, bastante elevada (TEIXEIRA, 2007).

Segundo a Associação Comercial do Rio de Janeiro (ACRJ) a biomassa pode ainda ser empregada como biofertilizante do solo; além de ser possível o pleito de créditos de carbono pela assimilação do CO<sub>2</sub>, resultado do processo de queima dos combustíveis fósseis e de práticas agrícolas impróprias, como as queimadas (ACRJ, 2008).

Outras vantagens da produção de alga para obtenção de biocombustíveis é esta produção que não compete com as culturas alimentares, amenizando a discussão que responsabiliza os biocombustíveis pela crise alimentar; e podem ser produzidas ininterruptamente em qualquer época. Há ainda a possibilidade de utilizar microalgas liofilizadas ou estão em estado de dormência. Assim quando se deseja começar o crescimento dessas microalgas basta fornecer meio ou nutrientes, como tem sido feito no Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI) de Portugal, há quase trinta anos (DIÁRIO DIGITAL, 2008).

No Ceará um contrato com o Centro de Energias Alternativas e Meio Ambientes (Cenea), presidido pelo cientista Osvaldo Carioca, desenvolverá de uma planta-piloto que produzirá um tipo de microalga que se reproduzirá e se alimentará do CO<sub>2</sub> a ser emitido pela chaminé da usina termelétrica do Pecém. A tecnologia usada será a mesma que Israel utiliza com êxito na termelétrica de Telaviv e reduzirá a zero a poluição causada pela queima de carvão mineral. O projeto-piloto utilizará uma área de 10 mil m<sup>2</sup> (um hectare), na qual construirá várias piscinas, cujo espelho d'água terá 20 centímetros de profundidade, onde a semente da microalga será espalhada e cujo crescimento se fará, em uma semana, pelo processo de fotossíntese (SERPA, 2008).

Apesar das inúmeras vantagens, o processo de obtenção de óleo através de microalgas apresenta uma desvantagem que, no final, torna o óleo duas vezes mais caro do que o óleo obtido através de qualquer outra oleaginosa. O meio aquoso onde as microalgas crescem não pode ter uma densidade de microalgas muito alta, pois isto impediria a radiação penetrar de forma homogênea em todo o fotobioreator, nestas condições o meio deve ser pouco concentrado e há a necessidade do uso de centrífuga para a concentração de biomassa para a produção do óleo (DIÁRIO DIGITAL, 2008).

**Tabela 6:** composição química do óleo de algumas microalgas.

Microalga	Principais Ácidos Graxos							
<i>Dunaliella salina</i>	C14:0	C14:1	C16:0	C16:3	C16:4	C18:2	C18:3	
<i>Isochrysis</i> sp.	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:1	C18:3	C18:4	C22:6
<i>Nannochloris</i> sp.	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C16:3	C20:5		
<i>Nitzschia</i> sp.	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C16:3	C20:6		

C14:0 (mirístico), C14:1 (miristoléico), C16:0 (palmítico), C16:1 (palmitoléico), C18:0 (oléico), C18:2 (linoléico), C18:3 (linolênico), C20:5 (eicosapenteneóico)

Fonte: TEIXEIRA, 2007.

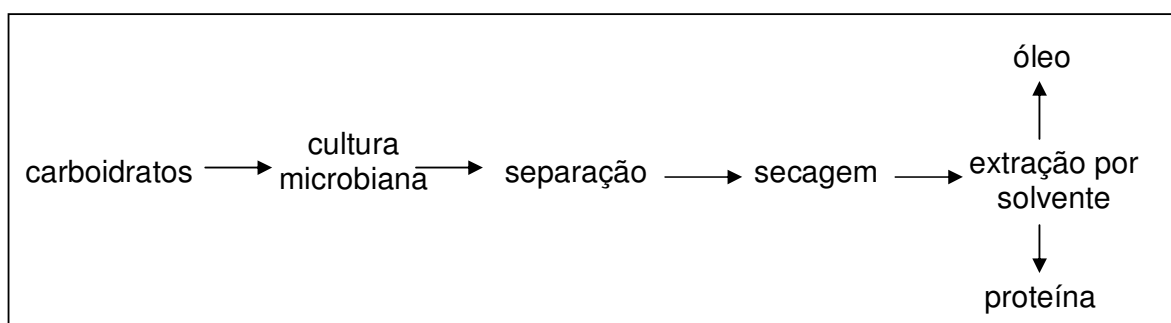
Outras possibilidades de obtenção de óleo a partir de microrganismos são relatadas por RATTRAY et al (1975); ANGELIS e COLABONE (1988).

Rattray et al (1975) elaborou um minucioso trabalho onde reuniu informações sobre classificação de leveduras quanto seu teor de lipídeos, química e bioquímica, fatores que afetam a sua produção e composição. As leveduras foram classificadas em: baixa produção <5%; média produção de 5 a 15% e alta produção > que 15% - estas são as oleaginosas.

Fideli, 1983 relata alguns teores de lipídeos de microrganismos:

Microrganismo	% lipídeo
<i>Cryptococcus sp</i>	68
<i>Lypomices sp</i>	49
<i>Lypomices lypolítica</i>	50-73
<i>Rhodotorula gracilis</i>	40-65
<i>Mucor sp</i>	65
<i>Aspergillus sp</i>	57

Segundo FIDELI (1983) a bioconversão segue um esquema geral de:



O óleo pode ser quimicamente trabalhado pela hidrogenação obtendo-se álcoois lineares que por oxidação auxiliada por catalisadores transformam-se em ácidos graxos.

A proteína pode destinar-se a alimentação humana ou ração animal.

### 3.3. Biorremediação

A biorremediação é a aceleração de um processo natural e, portanto, uma solução para o problema de poluentes que causam danos ao meio ambiente (HENCKLEIN, 2005; HENCKLEIN, 2008).

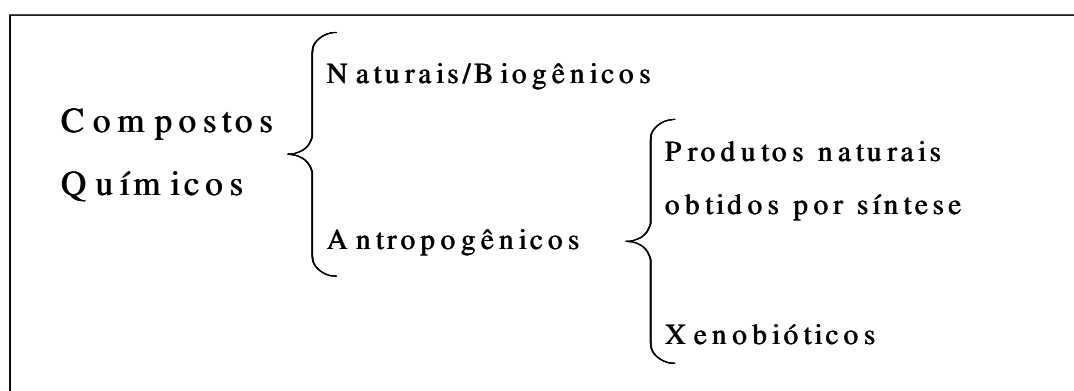
A biodegradação é definida como a transformação de compostos químicos orgânicos, mediante a atividade metabólica dos organismos que resulta na formação de gás carbônico e água (KATAOKA, 2001).

A biodegradação natural possui a vantagem de ser um processo de despoluição de um ambiente, sendo adotada como metodologia eficaz e de baixo custo para remediar solos poluídos (MORAIS, 2005)

A biodegradação do petróleo e outros hidrocarbonetos utilizando populações naturais de microrganismos foi o primeiro mecanismo usado para este tipo de despoluição (LEAHY e COLWELL, 1990)

Os microrganismos são os principais agentes de biodegradação de moléculas, sendo mais comum às bactérias e fungos ocorrerem em ambientes terrestres e bactérias e leveduras em ambientes aquáticos (BALBA et al (1998); INAZAKI, 2003).

A composição estrutural das substâncias químicas interfere na biodegradação. Há compostos naturais (biogênicos) que são encontrados na natureza, e até produzidos pelos microrganismos e compostos produzidos pelo homem que não são encontrados na forma natural (xenobiótico) como mostrado na figura 6. A biodegradação depende dos microrganismos adaptados e à similaridade do efluente com os compostos biogênicos (REVAH, 1996).



**Figura 6** – Tipos de compostos químicos

Fonte: REVAH, 1996

A comunidade microbiana relacionada à degradação de compostos xenobióticos pode ser dividida em dois grupos: os primários capazes de metabolizar a substância, e os secundários, não

utilizam diretamente o composto, mas sim os produtos liberados pelos microrganismos primários (Bull e Slater, 1982 *apud* GRADY 1985)

A microbiota nativa pode agir na recuperação ambiental, mas para acelerar o processo podem-se utilizar dois procedimentos: a bioestimulação e o bioenriquecimento. O primeiro consiste em acrescentar nutrientes e controlar fatores abióticos para que os organismos existentes aumentem a taxa de biodegradação, enquanto no segundo inocula-se microrganismos, seja de ambiente poluído, seja de cultura com capacidades desejáveis para a degradação do poluente (SARKAR, 2005).

Alguns fatores que podem interferir na taxa de crescimento e conseqüentemente na taxa de biodegradação como a biodegradabilidade, a toxicidade e a quantidade do poluente. Para a biodegradação recomenda-se colocar o substrato em menores parcelas com maior freqüência ao invés de uma maior acrescentada de uma única vez (KATAOKA, 2001).

A disponibilidade do poluente ao microrganismo, ou seja, a superfície de contato, também tem sua importância na biodegradação. Pode ser adicionado algum surfactante para facilitar o processo, porém deve-se tomar o mesmo cuidado com o produto a ser tratado, pois o surfactante pode apresentar toxicidade ou funcionar como substrato competitivo (RIZZO, 2003)

Quando a biorremediação ocorre diretamente no local poluído é denominado “in situ”, se o meio impactado for removido e tratado em outro local é chamado “ex situ” (Margesin, 2000 *apud* MORAIS, 2005).

A biorremediação “in situ” tem a vantagem de não apresentar custos e distúrbios ambientais associados com o transporte de solos e águas que estão contaminados para outros locais destinados ao tratamento. Os produtos finais de uma biorremediação efetiva são água e gás carbônico, que não apresentam toxicidade e podem ser incorporados ao ambiente sem prejuízo aos organismos vivos (MARIANO, 2006).

No processo “ex-situ”, onde o resíduo a ser tratado é transportado a outro local, são desenvolvidas algumas estratégias para auxiliar a ocorrência do processo. Para esta tecnologia existe maior abrangência no que diz respeito ao controle e manuseio das técnicas, pois permite que se acrescentem numerosos recursos quando comparado ao processo “in situ”, evitando maiores riscos de danos ao meio ambiente (FERNANDES, 2005).

Antes de decidir qual o melhor método e utilizá-lo em grande escala, são feitos testes para que haja maior conhecimento tanto da biodegradabilidade do resíduo poluente, quanto do sistema de tratamento a ser utilizado. Estes testes são feitos com métodos padronizados de grande aceitação entre os clientes e as autoridades (INAZAKI, 2003).

Mariano (2007) comprovou a maior biodegradabilidade do biodiesel em relação a mistura (biodiesel + diesel) e o óleo diesel.

Quando ocorre o acréscimo de um “pool” microbiano aumentam-se a probabilidade da degradação do biodiesel, além de ocorrer aumento da atividade microbiana com a adição deste combustível (OLIVEIRA et al, 2005).

Medidas respirométricas, como o consumo de oxigênio e produção de gás carbônico, têm sido utilizadas como evidência da biodegradação. Como a concentração de CO<sub>2</sub> é menor que a de O<sub>2</sub> na atmosfera, as medidas que utilizam a produção de CO<sub>2</sub> são mais sensíveis (KATAOKA, 2001).

O método respirométrico de Bartha é simples e de baixo custo se comparado a outros que são acoplados a computadores e podem chegar a ter custo mil vezes superior. A técnica de Bartha e Pramer tem a utilidade de determinar a degradação de resíduos, com a vantagem de ser possível uma infinidade de condições, desde que estas estejam especificadas (PONTES, 2001; MARIANO, 2008).

Hidrocarbonetos aromáticos em geral são mais resistentes e alguns fungos são eficientes em promover a sua decomposição. Satow (2005) isolou algumas linhagens de “leveduras negras” capazes de promover a biodegradação destes compostos. Diferente do que possa parecer, leveduras negras é um grupo de fungos heterogêneos quanto a taxonomia e filogenia e que possui a coloração escura e crescimento lento em meios de cultura tradicionais.

Por outro lado, existem os fungos unicelulares, as leveduras, que são eficientes biodegradadoras de cadeias carbônicas lineares como espécies do gênero *Candida* e *Rhodotorula*. Tais leveduras podem ser empregadas na recuperação de solos e águas contaminadas com gorduras como a *Candida viswanathii* (FOGAÇA, 2007).

Oliveira (2007) indicou que a *C. viswanathii* possui maior facilidade de degradar o biodiesel de origem animal comparado com o óleo de soja e o diesel.

Por meio de testes em que halos de crescimento e halos de formação de cristais de cálcio, foi possível comprovar a atividade lipolítica e o índice enzimático respectivamente da *C. viswanathii* (FOGAÇA, 2007).

Chaillan (1990) verificou, em solos contaminados e em agregados de cianobactérias presentes em água poluída com petróleo, no sudoeste de Kalimantan (Ilha Bornéu, Indonésia), que existem microrganismos com atividades degradadoras. Destes microrganismos foram identificadas oito espécies de bactérias, 21 de fungos e cinco de leveduras; entre elas a *Candida viswanathii*. Espécie identificada foi isolada do tratamento de efluente da refinaria de Paulínia.

Esta levedura apresentou bom crescimento e atividade enzimática em meio contendo glicerol, subproduto do biodiesel. A *C. viswanathii* apresenta-se como um novo e atraente biocatalizador capaz de realizar a biorredução de uma grande variedade de cetonas, com melhor eficiência que outros microrganismos reconhecidos recentemente com esta função (SONI, 2006).

Neste trabalho *C. viswanathii* foi utilizada para estimular a biodegradação de biodiesel de origem animal.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

- Meio Sabouraud (DIFCO 1984),
- Meio Potato Dextrose Agar (PDA) (DIFCO 1984),
- Meio Plate Count Agar (PCA) (DIFCO 1984),
- Antibióticos: actidiona, ampicilina e ácido nalidíxico,
- Meio para cultivo de microrganismos lipolítico (AARONSON, 1970),
- Meio de Corn Meal (LODDER, 1971),
- Meio de Malte (DIFCO 1984),
- Respirômetro de BARTHA e PRAMER (1965),
- Peneira de acordo com ABNT, com abertura de 1,62mm,
- Amostra do biodiesel (origem animal),
- Reagentes químicos e vidraria usual de laboratório de microbiologia e química,
- Equipamentos: espectrofotômetro, shaker com temperatura controlada , microscópio, estufas, autoclave, contador de colônias, câmara de Neubauer.
- Solo da Estação Ecológica de Itirapina, localizada entre os municípios de Itirapina e Brotas, no Estado de São Paulo, Brasil (22°13´S e 47°49´W).
- Efluente de refinaria.
- Reagentes:
  - água destilada isenta de CO<sub>2</sub>
  - solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2N
  - soluções indicadoras de pH – vermelho de metila e fenolftaleína

- solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1N
- solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0,1
- solução de cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ) 1N
- solução salina 0,85%

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Isolamento

Do efluente de refinaria de petróleo tratado biologicamente, isolou-se em meio de PDA uma linhagem de levedura formadora de pseudomicélio. Esta levedura mostrou-se capaz de metabolizar hidrocarbonetos e lipídeos. A cultura foi mantida em laboratório no mesmo meio. Posteriormente foi cultivada em meio para cultivo de microrganismo lipolítico (AARONSON, 1970). Neste meio acrescentou-se biodiesel de origem animal como única fonte de carbono.

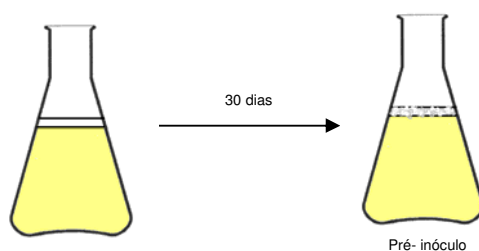
### 4.2.2. Procedimento para identificar a levedura

Inicialmente a cultura foi submetida a um microcultivo utilizando “corn meal” para a observação de sua morfologia. A seguir a cultura foi mantida em meio de malte para posterior identificação. A identificação foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, por meio de Taxonomia molecular, mediante os seguintes ensaios: certificação da pureza da cultura, extração de DNA genômico, sequenciamento de DNA, PCR DNAr 28S (região D1/D2) e análise filogenética.

## 4.3. Ensaio com a levedura

### 4.3.1. Adaptação e manutenção da levedura

Em meio de cultivo para microrganismos lipolíticos acrescentou-se 10 mL de biodiesel para cada 100 mL de meio, A seguir inoculou-se a levedura que permaneceu em etapa de adaptação por 30 dias, constituindo o pré-inóculo dos experimentos.



**Figura 7:** Protocolo experimental para adaptação da levedura em meio com biodiesel.

### 4.3.2. Obtenção de inóculo para o ensaio respirométrico.

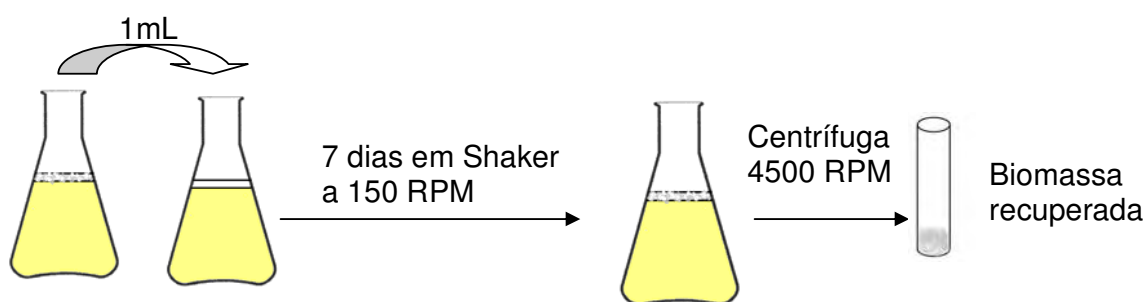
O meio para microrganismos lipolíticos foi preparado e distribuído em Erlenmeyers de 250mL contendo cada um 100 mL de meio.

O meio foi esterilizado a 1atm a 120 °C por 15 minutos e após o resfriamento acrescentou-se 10mL de biodiesel e 5mL de pré-inóculo de levedura (4.3.1).

Os frascos foram colocados em shaker a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 7 dias a uma velocidade de 150 rpm.

A seguir as culturas foram centrifugadas durante 10 minutos a uma rotação de 4500 rpm. Descartou-se o sobrenadante, e a biomassa recuperada foi lavada com água destilada. A biomassa recuperada foi suspensa em solução salina 0,85% para servir de inóculo no experimento de biodegradação.

O número de células da suspensão foi quantificado microscopicamente em câmara de Neubauer, computando-se  $3,36 \times 10^{10}$  cel/mL da suspensão



**Figura 8:** Protocolo experimental obtenção de biomassa para o inóculo utilizado na respirometria.

### 4.3.3. Método de coleta e preservação do solo

O solo de cerrado foi coletado, de acordo com a orientação da Norma Técnica L6.245 da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB, 1984).

Após a coleta o solo foi armazenado em câmara fria à 4 °C, para ser preservado até sua utilização nos ensaios.

O solo escolhido foi o localizado numa estação ecológica de Itirapina pela disponibilidade e por sua utilização prévia em teste de biodegradação de biodiesel (OLIVEIRA, 2005) e de estabilização de landfarming (HENCKLEIN, 2005; HENCKLEIN, 2008).

#### 4.3.4. Caracterização físico química do solo

A análise físico-química da amostra de solo foi realizada no início dos experimentos pelo Instituto Campineiro de Análise de Solo (ICASA). As leituras realizadas pelo ICASA são feitas em Espectrômetro de emissão por Plasma (ICP – Inductivity Coupled Plasma). Excetuando-se a determinação da capacidade de campo e umidade relativa, descritas a seguir.

No início e no final de cada ensaio foi realizada a análise de matéria orgânica (MO) de cada tratamento, pelo mesmo Instituto.

#### 4.3.5. Capacidade de Campo

Para a realização dos experimentos respirométricos os solos foram secos ao ar e peneirados em peneira ABNT com gramatura de 1,62mm. Efetuou-se a medida da capacidade de campo (CC) e padronizada para a umidade para 70 e 90% desta (Adaptada de ANDERSON e INGRAM, 1996).

A capacidade de campo do solo e das misturas utilizadas constitui na determinação da quantidade de água necessária para se obter a saturação do solo. A CC foi calculada mediante método gravimétrico saturando-se o solo (S1) e, após período de 24 horas, foi pesado  $1 \pm 0,001\text{g}$  do material em cadinho (S1Ca), previamente seco e tarado, e levado à estufa a  $105^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Após esse período, o conjunto cadinho + solo (S1SCa) foram pesados e, calculou-se a quantidade máxima de água (A1) para saturar o material estudado.

$$A1 = (S1SCa) - (S1Ca)$$

Para se calcular a umidade já existente no solo e tratamento, retirou-se cerca de  $1 \pm 0,001\text{g}$  de substrato (S2), de cada tratamento, e colocou-se em cadinhos (C), previamente tarados (CS2). Após 24 horas de permanência em estufa a  $105^\circ\text{C}$ , pesou-se o conjunto (cadinho + substrato – CS3), e calculou-se a água existente (A2) da seguinte forma:

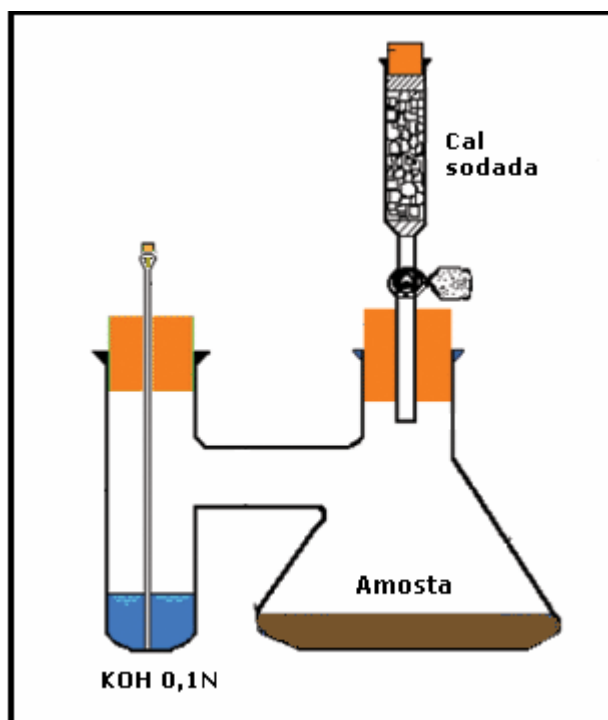
$$A2 = (CS2 - CS3)$$

A adição de biodiesel e suspensão de levedura seguiram a correção da umidade do solo para 70 e 90% da CC. Assim, os tratamentos onde não houve acréscimo de biodiesel e suspensão de leveduras, a umidade foi padronizada acrescentando-se água.

#### 4.3.6. Acompanhamento da biodegradação da amostra biocombustível em respiômetros de Bartha & Pramer utilizando diferentes quantidades de água

Dois ensaios foram realizados segundo a norma L 6.350 da CETESB (1990) “Solos- Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método respirométrico de Bartha” e ABNT (1999),

NBR 14.283 da Associação Brasileira de Normas Técnicas. Esta norma utiliza a quantificação de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) produzido em um sistema fechado (respirômetro). Este respirômetro é constituído de duas câmaras interligadas, onde uma contém o substrato, que está sendo analisado, e a segunda possui uma solução alcalina (hidróxido de potássio 0,2N – KOH), que reage com o  $\text{CO}_2$  liberado pela biodegradação do substrato, que ocorreu na primeira câmara (Figura 4).



**Figura 9** - Esquema do método respirométrico de Bartha e Pramer (CETESB, 1990).

Calculou-se a umidade do solo para ajuste da capacidade de campo. Os experimentos foram realizados em 9 tratamentos com três repetições para cada um.

No primeiro houve o ajuste da capacidade de campo de 70% e os tratamentos foram incubados durante 60 dias a 28°C., de acordo com o protocolo experimental (Tabelas 7):

**Tabela 7** - Protocolo experimental do ensaio de respirometria com 70% de capacidade de campo

Tratamentos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nº Frasco	1; 2; 3	4; 5; 6	7; 8; 9	10; 11; 12	13; 14; 15	16; 17; 18	19; 20; 21	22; 23; 24	25; 26; 27
Solo (g)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Biodiesel (mL)		0,1	0,2			0,1	0,1	0,2	0,2
Levedura (mL)				0,14	0,28	0,14	0,28	0,14	0,28
H <sub>2</sub> O (mL)	11,54	11,44	11,34	11,40	11,26	11,20	11,16	11,20	11,06

No segundo experimento houve o ajuste da capacidade de campo de 90% ,também incubados por um período de 60 dias a 28°C, de acordo com o protocolo experimental (Tabela 8):

**Tabela 8** - Protocolo experimental do ensaio de respirometria com 90% de capacidade de campo.

Tratamentos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nº Frasco	1; 2; 3	4; 5; 6	7; 8; 9	10; 11; 12	13; 14; 15	16; 17; 18	19; 20; 21	22; 23; 24	25; 26; 27
Solo (g)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Biodiesel (mL)		0,1	0,2			0,1	0,1	0,2	0,2
Levedura (mL)				0,14	0,28	0,14	0,28	0,14	0,28
H <sub>2</sub> O (mL)	14,83	14,73	14,63	14,69	14,55	14,59	14,45	14,49	14,35

1 = somente solo no frasco

2 = 0,1 mL de biodiesel

3 = 0,2 mL de biodiesel

4 = 0,14 mL de levedura

5 = 0,28 mL de levedura

6 = 0,1 mL de biodiesel e 0,14 mL de levedura

7 = 0,1 mL de biodiesel e 0,28 mL de levedura

8 = 0,2 mL de biodiesel e 0,14 mL de levedura

9 = 0,2 mL de biodiesel e 0,28 mL de levedura

A solução alcalina do respirômetro de Bartha e Pramer foi periodicamente retirada e repostada, tomando-se os cuidados para impedir a entrada de CO<sub>2</sub> externo (utilizou-se coluna de cal sodada), buscando-se avaliar a taxa de biodegradação durante o tempo. Após a retirada, esta foi transferida para um erlenmeyer de 150 mL, onde foi acrescentado 1 mL de cloreto de bário 1N e 2 gotas de solução de fenolftaleína, como indicador ácido-base. Titulou-se com ácido clorídrico 0,1N e anotou-se a quantidade de ácido utilizada, para alcançar a viragem do indicador na solução alcalina.

Este procedimento foi realizado para todos os respirômetros. Um frasco contendo solução alcalina recém preparada e dos demais componentes anteriores foi também titulado com HCl 0,1N. Este frasco foi considerado a solução controle, cujo valor foi comparado com as leituras efetuadas nos respirômetros.

Para realizar o ensaio, procedeu-se a contagem inicial do número de bactérias e fungos existentes no solo, empregando-se meio PCA acrescido de actidiona (contagem de bactérias) e PDA acrescido de ampicilina e ácido nalidíxico (fungos).

Pesaram-se 10 g dos diferentes tratamentos e foram colocados em 90 mL de salina esterilizado.

Os frascos foram agitados por 10 minutos em shaker na velocidade de 150 RPM e a seguir alíquotas diluídas foram plaqueadas nos meios para bactérias e fungos.

Após a incubação de 48 horas a 36 °C para bactérias e 7 a 28°C dias para fungos, as colônias foram contadas e o número de microrganismos relatados como unidades formadoras de colônias por grama de solo seco (UFC/g).

Finalizando os experimentos após 60 dias repetiu-se a contagem dos microrganismos

#### 4.3.7 pH do solo

Foram feitas determinações de pH dos tratamentos, utilizando o potenciômetro, para tanto foram colocados 10 g de cada tratamento em béqueres de 50mL e acrescido 25 mL de água destilada, agitado por 15 minutos em agitador magnético e deixado em repouso por uma hora.

#### 4.3.8 Solubilização do solo

Colocou-se de 50 g de amostra de cada tratamento em frascos de 600 mL, ao qual acrescentou-se 300 mL de água deionizada que foi e agitada em baixa velocidade por 5 minutos. Estes frascos decantaram por 7 dias. A seguir as soluções foram filtradas com aparelho de filtração guarnecido com membrana filtrante com 0,45 µm de porosidade e os filtrados foram preservados para a análise de toxicidade segundo a norma da ABNT.

#### 4.3.9. Verificação da toxicidade a *Daphnia similis*

O teste de toxicidade aguda utilizando o microcrustáceo *Daphnia similis*, segundo a norma L50018 da CETESB (1991), consiste em expor os organismos a diferentes concentrações das amostras, durante o período de 48 horas, nesse período verifica-se a sobrevivência dos organismos. A partir destes dados é calculada a CE<sub>50</sub> concentração letal a 50% dos indivíduos no período do teste.

#### 4.3.10. Cálculos

##### - Produção de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2p</sub>)

A quantidade de CO<sub>2</sub> produzido foi calculada a partir da fórmula: no respirômetro:

$$CO_{2p} = (A-B) \times 50 \times f_{HCl} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

**A** = volume de HCl 0,1N gasto para titular o branco, em mL

**B** = volume de HCl 0,1N gasto para titular o tratamento, em mL

**50** = fator para transformar equivalente em µmol de CO<sub>2</sub>

**f<sub>HCl</sub>** = fator do HCl 0,1N (0,1/normalidade do HCl utilizado)

O cálculo do CO<sub>2</sub> produzido devido à biodegradação (CO<sub>2b</sub>) é feito subtraindo-se a quantidade de CO<sub>2p</sub> no respirômetro controle (somente com solo) da quantidade obtida no respirômetro teste.

#### - Carbono Biodegradado (C<sub>b</sub>)

Admitindo que 50% do carbono biodegradado se transforma em CO<sub>2</sub> e que os 50% remanescentes incorporam-se ao solo sob a forma de húmus e biomassa, o valor do carbono biodegradado (C<sub>b</sub>) é calculado pela fórmula:

$$C_b = 2 \times CO_{2b} \quad \text{Equação (2)}$$

#### - Eficiência de Biodegradação (EB)

A EB é calculada da seguinte forma:

$$EB \% = (C_b/C_i) \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

CI (μmol) = quantidade de carbono inicial aplicada por 50g de solo, assim calculada (Equação 4):

$$CI = COT/12 \quad \text{Equação (4)}$$

COT= carbono orgânico total inicial, em μg/g

12 = fator de conversão, em μg/μmol de carbono.

#### 4.3.11. Quantificação do número de bactérias e fungos dos tratamentos do ensaio respirométrico

A avaliação do desenvolvimento de microrganismos foi realizada mediante contagem das Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo seco (UFC/g/ss) no início e final do ensaio respirométrico.

Preparou-se uma suspensão de solo misturando-se 10g com 90mL de solução salina estéril (0,85% de cloreto de sódio - NaCl). Após a agitação de 15 minutos, aguardou-se 5 para decantação e coletou-se o líquido sobrenadante. Este foi adequadamente diluído para os plaqueamentos e posteriores contagens das colônias de microrganismos. Os meios utilizados foram: Plate Count Agar (PCA) para bactérias e extrato de malte com agar para fungos. Após a inoculação, as culturas foram mantidas a 36 ± 1oC para bactérias e 28 ± 1oC para fungos. Para quantificar a UFC/g/s verificou-se o peso seco do solo mediante sua secagem em estufa 105o C por duas horas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

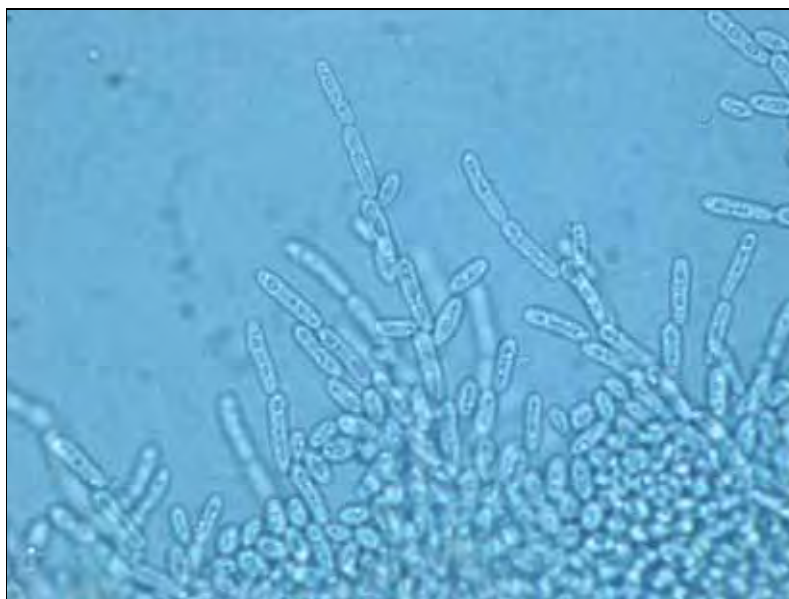
### 5.1. Identificação de Levedura

A levedura foi identificada como *Candida viswanathii* por 99% de similaridade, apresentando características morfológicas e fisiológicas muito similares às outras espécies como *C. tropicalis*, *C. maltosa*, *C. parapsilosis* e *C. sake*.

As figuras 10 e 11 mostram respectivamente a cultura de *C. viswanathii* em meio de malte, e corn meal.



**Figura 10** - Aspecto geral da cultura da levedura *Candida viswanathii*.



**Figura 11** - Aspecto morfológico da levedura evidenciando a formação de pseudomicélio vista no microscópio com aumento de 400 x.

## 5.2. Caracterização física e química do solo

Solo coletado, de acordo com a norma técnica L.6.245(1984) CETESB, da Estação Ecológica de Itirapina, localizada entre os municípios de Itirapina e Brotas, no Estado de São Paulo, Brasil (22°13'S e 47°49'W). Foi analisado pelo Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo LTDA (ICASA), quanto à matéria orgânica (MO), macronutrientes, micronutrientes, metais pesados e textura do solo.

Nas Tabelas 9 e 10 estão apresentados os parâmetros químicos e composição granulométrica do solo empregado no ensaio respirométrico. O solo utilizado apresenta características de composição predominantemente arenosa, associado com o alto teor de água a maior possibilidade de difusão do oxigênio que permitem melhor oxigenação, estimulando o metabolismo oxidativo dos microrganismos aeróbios, conduzindo a melhores resultados de biodegradação aeróbia.

**TABELA 9** – Quantificação das principais íons do solo do cerrado de Itirapina.

Principais mg/dm <sup>3</sup>															
K	Ca	Mg	Al	S	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	B	Ba	Cd	Cr	Ni	Pb
6,0	1,0	1,0	6,0	10,0	3,0	25,0	0,6	0,9	0,9	0,2	14,4	<0,01	11,9	<0,01	<0,01

**Tabela 10** – Características granulométricas do solo do cerrado de Itirapina, pH e matéria orgânica (MO).

Composição percentual do solo						
pH	MO	Grossa	Fina	Argila	Limo	Cascalho
	g/dm <sup>3</sup>				%	
4,0	8,0	47,0	39,0	9,9	4,1	0,0

### 5.3. Ensaio respirométricos

#### Quantidade do gás carbônico produzido por dia de tratamento.

Os tratamentos do solo onde houve apenas o acréscimo de leveduras tiveram valores menores de evolução de CO<sub>2</sub>, não foi registrado valores significativamente diferentes quando o inóculo foi adicionado ao do solo.

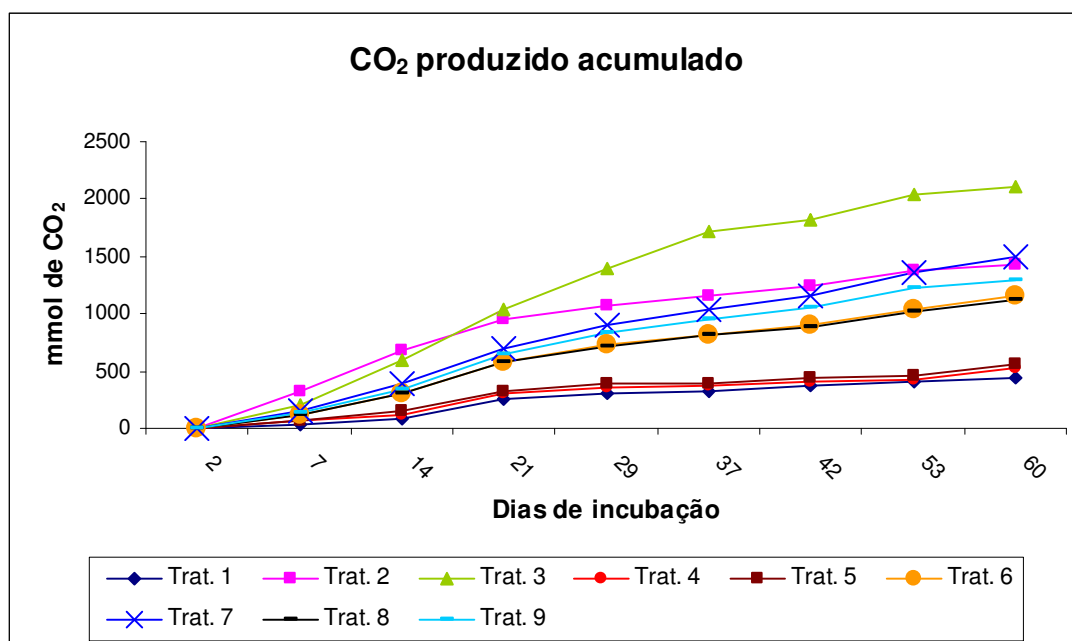
Os tratamentos do solo com as menores quantidades de biodiesel apresentaram maior produção de CO<sub>2</sub>. As respostas à produção de CO<sub>2</sub> aos tratamentos e com *C. viswanathii* induziram aumento na produção do gás carbônico quando havia maior quantidade de levedura e biodiesel.

Pode-se inferir que o teor de água associada retardou a degradação do biodiesel, pois analisando se as figuras 7; 8; 9 e 10 verifica-se que houve menor quantidade de gás produzido no teste com 90% da capacidade de campo em relação ao teste com 70%. A biodegradação quando o biodiesel está em contato com solo com condição 70%CC mantém-se continuidade da evolução do CO<sub>2</sub> (Figura 7). Por outro lado a Figura. 4 mostra que excesso de umidade compromete a biodegradação do biodiesel, mesmo quando acrescenta-se microrganismo com capacidade de biodegradação de substâncias oleaginosas (FOGAÇA, 2007).

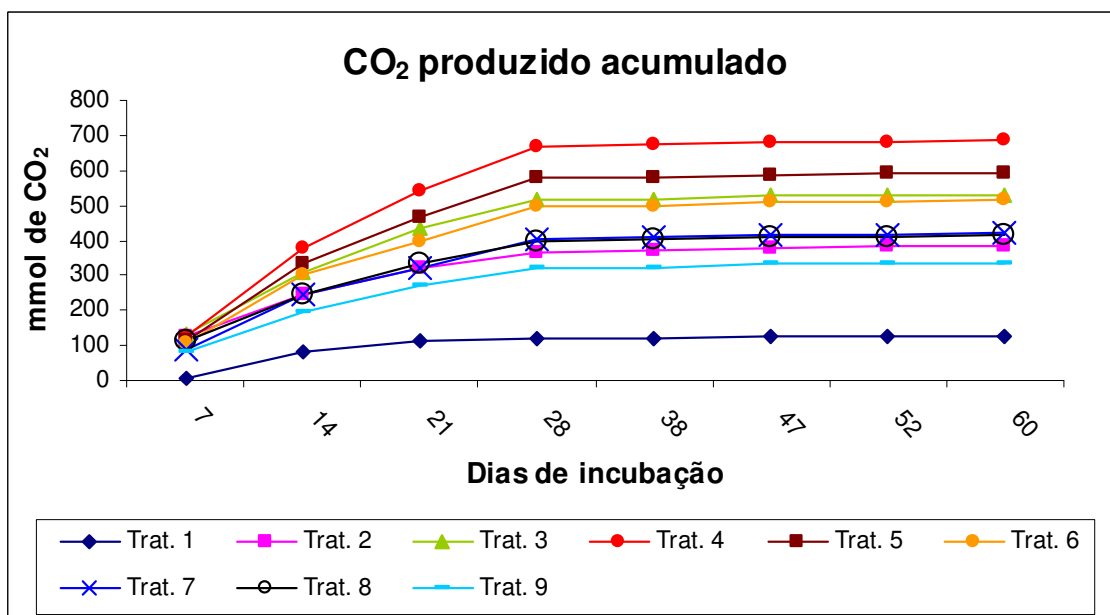
KATAOKA (2001) havia verificado que excesso de água dificultava a biodegradação de hidrocarbonetos.

Os estudos de combustão de biodiesel realizados na Universidade de São Paulo - Laboratório de Desenvolvimento de Tecnologia Limpa, considera que o uso deste novo combustível pode diminuir as emissões de enxofre em 20%, gás carbônico 9,8%, hidrocarbonetos 14,2%, material particulado 26,8% e NOx 4,6%. A substituição do óleo diesel por biodiesel trará importantes impactos positivos ao meio ambiente trazendo implicitamente benefícios econômicos e propicia a possibilidade de obtenção de créditos de carbono (LIMA MENDONÇA, 2007).

Tratando-se da biodegradação natural ou estimulada do biodiesel esta é lenta e dependendo da quantidade de água com 70% a evolução de CO<sub>2</sub> aconteceu em melhor taxa que a mistura com 90% de saturação de água. Infere-se, pois que a degradação do biodiesel insere nova problemática ao meio ambiente em relação ao já existente diesel, quando áreas alagadas forem atingidas. Estes resultados mostraram que o tempo de recuperação será maior em áreas alagadas.



**Figura 12** - Gás Carbônico produzido no ensaio de respirometria realizado na presença da *C. viswanathii* e biodiesel durante 60 dias com 70% de capacidade de campo e temperatura de 28 °C.



**Figura 13** - Gás Carbônico produzido no ensaio de respirometria realizado na presença da *C. viswanathii* e biodiesel durante 60 dias com 90% de capacidade de campo e temperatura de 28 °C.

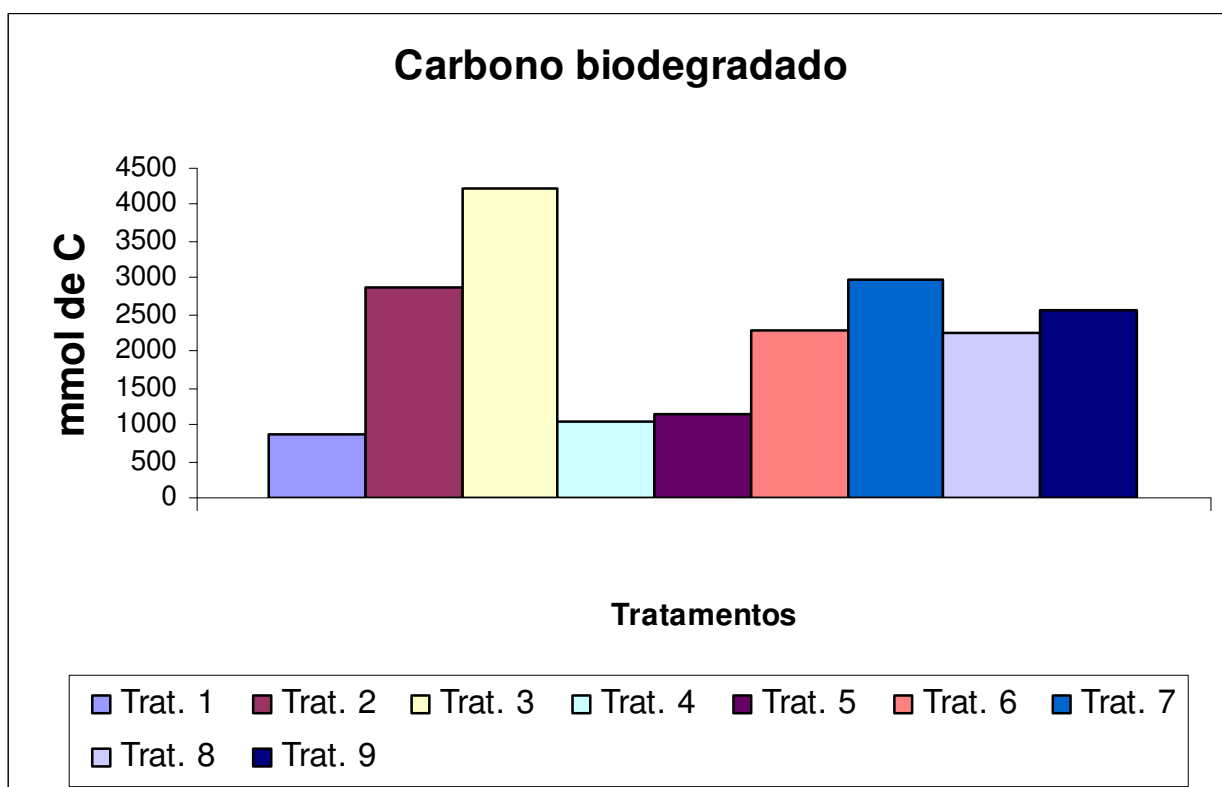
As figuras 12 e 13 assumem importância no momento em que se extrapolam estes dados para área ambiental em caso de acidentes. Com biodiesel a degradação seria lenta, em solos pobres e que apresentam uma microbiota relativamente escassa.

Para que ocorra uma degradação razoável de um substrato recomenda-se uma população de microrganismos com ao menos de  $10^7$  unidades/g/mL.

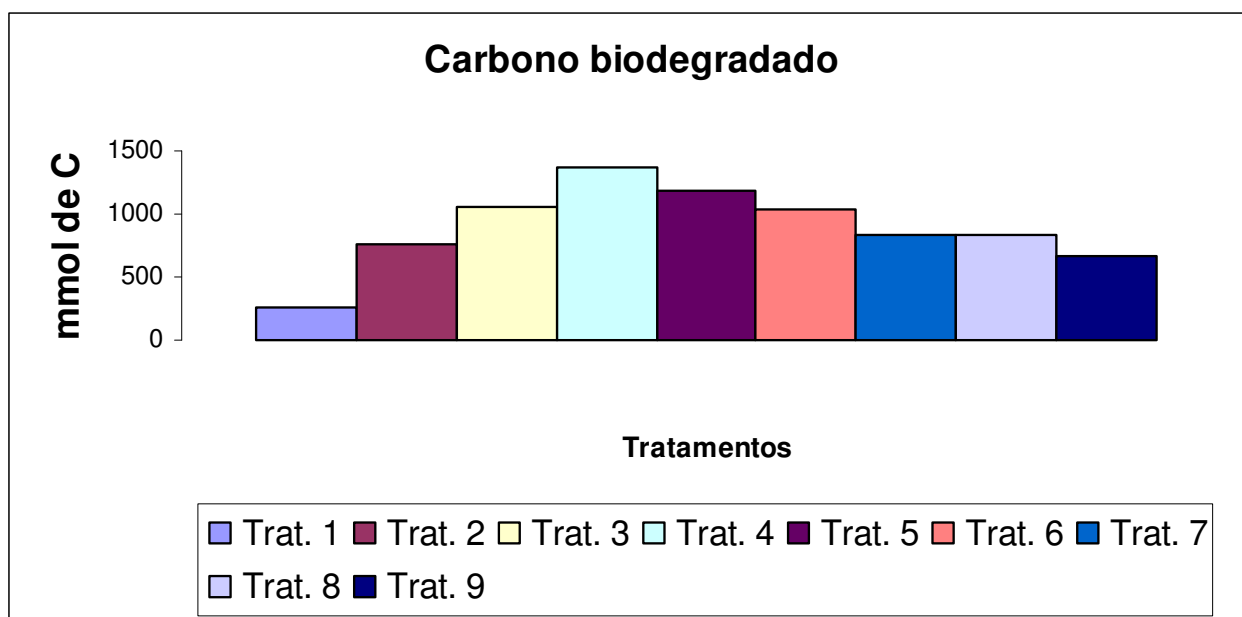
A Figura. 12 mostra que ainda que em baixa taxa de degradação a adição de microrganismos capazes de degradar substâncias gordurosas é importante.

#### 5.4. Quantificação de Carbono Biodegradado

Admitindo que os microrganismos assimilem carbono existente no biodiesel, além de liberá-lo na forma de gás carbônico, assume-se que o carbono biodegradado seja o dobro do produzido acumulando-se no solo na forma de biomassa microbiana ou húmus; tem-se a Figura. 14 e 15.



**Figura 14** – Quantidade de carbono biodegradado acumulado no final do ensaio de respirometria realizado na presença da *C. viswanathii* e biodiesel durante 60 dias com 70% de capacidade de campo e temperatura de 28 °C.



**Figura 15** - Quantidade de carbono biodegradado acumulado no final do ensaio de respirometria realizado na presença da *C. viswanathii* e biodiesel durante 60 dias com 90% de capacidade de campo e temperatura de 28 °C.

Analisando-se os dois experimentos pode verificar nas Figura. 9 e 10 que a degradação do biodiesel com 90% de CC no solo fica prejudicada.

### 5.5. pH dos tratamentos

Tanto nos tratamentos com 70 e 90% de CC houve aumento no valor do pH após o período de 60 dias de incubação. Porém a 90% de CC a diferença observada foi acentuada, indicando que a maior quantidade de água ocasionou a formação de substâncias que elevaram o pH dos tratamentos.

**Tabela 11** – Quantificação dos pH dos tratamentos nos solos contaminados com biodiesel e com adição de *C. viswanathii* com umidade de 70 e 90% da capacidade de campo

Tratamentos	Capacidade de campo%			
	70		90	
	pH		pH	
	T <sub>0</sub>	T <sub>60dias</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>60dias</sub>
1	4,31	4,92	3,85	3,56
2	4,39	5,59	3,93	4,99
3	4,45	5,11	3,95	5,07
4	4,41	4,46	3,89	4,47
5	4,26	4,48	3,89	5,6
6	4,37	4,98	3,95	5,23
7	4,36	4,97	3,9	4,95
8	4,29	4,93	4,43	4,62
9	4,46	4,92	4,23	4,97

Possivelmente nos experimentos com 70% de CC, que liberou mais CO<sub>2</sub>, ocorreu a formação de ácido carbônico, que impediu o aumento de pH observado onde há mais água livre. No controle dos tratamentos de 90% de CC houve decréscimo do pH, possivelmente explicável pelo metabolismo oxidativo dos microrganismos autóctones que foi estimulado pelo acréscimo de água no meio.

### 5.6. Toxicidade dos tratamentos a *Daphnia similis*

As amostras dos solubilizados dos tratamentos foram utilizadas para a verificação da toxicidade utilizando *D. similis* e após a exposição de 48 horas os organismos estavam todos vivos, indicando que não houve indução a toxicidade.

O teste de toxicidade foi repetido com os solubilizados dos tratamentos após os ensaios respirométricos e o resultado foi idêntico.

Segundo Perterson e Müller (2006), o biodiesel é menos tóxico para *Daphnia magna* que a substância tóxica de referência (NaCl) e que o combustível diesel. Estes testes foram realizados tanto testes estáticos como o presente experimento, com biodiesel de colza e de soja, sendo o último mais tóxico. A falta de indícios de toxicidade no teste com biodiesel de origem bovina pode indicar que esta matéria prima seja melhor em termos ecológicos, provocando menos prejuízo ao ambiente.

### 5.7. Plaqueamento e contagem dos microrganismos em unidades formadoras de colônias g/solo dos tratamentos

Pelo plaqueamento observou-se que houve acréscimo do número de unidades formadoras de colônias em todos os tratamentos após incubação de 60 dias.

**Tabela 12** – Contagem de unidades formadoras de colônias g/solo com 70% da capacidade de campo (CC) x 10<sup>4</sup>

Tratamentos	Unidades Formadoras de Colônias g/solo com 70% CC			
	Bactérias		Fungos	
	T <sub>0</sub>	T <sub>60</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>60</sub>
1 Solo	1,3	11,4	0,3	2,3
2 Solo + 0,1 mL Biodiesel	6,5	21,4	0,6	3,1
3 Solo + 0,2 mL Biodiesel	22,0	15,8	0,2	42,0
4 Solo + 0,14 mL Levedura	23,7	149,0	11,0	24,6
5 Solo + 0,28 mL Levedura	17,1	838,9	27,7	23,2
6 Solo + 0,1 mL Biodiesel + 0,14 mL Levedura	109,5	320,9	46,4	22,6
7 Solo + 0,1 mL Biodiesel + 0,28 mL Levedura	39,5	1737,9	17,4	1242,3
8 Solo + 0,2 mL Biodiesel + 0,14 mL Levedura	19,6	708,8	13,5	347,9
9 Solo + 0,2 mL Biodiesel + 0,28 mL Levedura	96,8	834,6	16,1	198,4

**Tabela 13** – Contagem de unidades formadoras de colônias g/solo com 90% da capacidade de campo (CC) x 10<sup>4</sup>

Tratamentos	Unidades Formadoras de Colônias g/solo com 90% CC			
	Bactérias		Fungos	
	T <sub>0</sub>	T <sub>60</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>60</sub>
1 Solo	0,6	55,4	0,7	0,4
2 Solo + 0,1 mL Biodiesel	2,4	34,0	4,8	0,8
3 Solo + 0,2 mL Biodiesel	43,8	45,9	0,4	0,4
4 Solo + 0,14 mL Levedura	85,0	85,0	7,1	10,6
5 Solo + 0,28 mL Levedura	112,8	82,4	62,1	28,2
6 Solo + 0,1 mL Biodiesel + 0,14 mL Levedura	70,6	388,6	8,5	2,8
7 Solo + 0,1 mL Biodiesel + 0,28 mL Levedura	112,5	344,8	26,0	14,1
8 Solo + 0,2 mL Biodiesel + 0,14 mL Levedura	49,3	345,2	37,3	14,1
9 Solo + 0,2 mL Biodiesel + 0,28 mL Levedura	98,2	306,9	45,6	6,3

Analisando as tabelas 12 e 13, observa-se que os fungos são mais sensíveis a alteração de pH que as bactérias, pois a 70% de CC houve crescimento mais acentuado das UFCs das bactérias que nas dos fungos.

A 90% de CC as unidades formadoras de colônias dos fungos apresentaram acentuado decréscimo e ocorreu a predominância de *C. viswanathii*, o que pode indicar que a levedura resiste melhor a condição de alta hidratação. Pelo número de UFC/g bactérias e fungos encontrados no final dos experimentos, a biodegradação não teria condições de evolução rápida. Pois para que ocorra degradação de qualquer material a curto prazo é desejável que o número de microrganismos com potencial de degradar este material seja superior a 10<sup>7</sup> UFC/g/mL (informação pessoal do Dr. F. Yokoya).

### 5.8. Eficiência da respirometria

Pelos cálculos da respirometria a tabela 14 indica que houve melhor eficiência no teste com 70% da capacidade de campo. Porém onde havia apenas microrganismos autóctones a eficiência foi maior. A melhor eficiência ocorreu no tratamento em presença de *C. viswanathii* com a maior quantidade de biodiesel.

Com 90% de CC a maior eficiência apresentou-se nos tratamentos que possuía apenas o acréscimo da levedura, indicando que seu metabolismo é dependente de água. Pôde-se observar também que onde havia a *C. viswanathii*, o acréscimo de maior quantidade de biodiesel diminuiu a eficiência da biodegradação de modo inverso ao tratamento com 70% de CC. Quanto a diminuição da eficiência pode-se inferir que para a biodegradação do biodiesel os microrganismos são dependentes de O<sub>2</sub>. Como os óleos formam uma camada na superfície da água, isto pode ter conduzido a deficiência de oxigenação no sistema que impediu a  $\beta$ -oxidação do biodiesel.

**Tabela 14** – Eficiência de Biodegradação nos dois experimentos de avaliação da evolução de CO<sub>2</sub> com solos contendo 70 e 90% da capacidade de campo

Eficiência de Biodegradação – em Porcentagem		
Tratamentos	70% CC*	90% CC*
1	10,28	3,54
2	37,67	11,77
3	55,58	16,26
4	13,8	20,98
5	11,76	19,61
6	30,19	15,76
7	34,33	12,89
8	22,84	10,9
9	26,36	8,83

\* CC - Capacidade de Campo

Os resultados também mostraram que o acréscimo de água nos tratamentos onde os microrganismos autóctones eram os únicos presentes resultou na diminuição em 3 vezes a eficiência em relação ao tratamento com 70% de CC. Este fato confirma a hipótese de impermeabilização e dificuldades trocas gasosas nos reatores de Bartha.

## 6. CONCLUSÃO

A levedura isolada de efluente de refinaria de petróleo foi identificada como *Candida viswanathii*.

Concluiu-se que a *C. viswanathii* possui o potencial de degradar o biodiesel de origem animal. Esta capacidade de degradação é afetada positivamente pelo acréscimo de água e negativamente pelo acréscimo de maior quantidade de biodiesel.

A levedura beneficia-se na competição entre fungos autóctones, quando o tratamento possui 90% de capacidade de campo.

As bactérias presentes no solo também promovem a biodegradação do biodiesel.

Os resultados indicaram que a capacidade de campo superior a 70% diminui a eficiência da biodegradação do biodiesel.

Quanto à toxicidade não há diferenças entre os solubilizados dos tratamentos antes e depois dos experimentos, sendo atóxicos aos microcrustáceos *Daphnia similis*.

A quantidade de biomassa de levedura e de biodiesel influenciam a biodegradação.

O solo de cerrado mostrou capacidade de biodegradar biodiesel.

Há necessidade de um período de lag fase para início da biodegradação de biodiesel.

## 7. REFERÊNCIAS

- AARONSON, S., **Experimental Microbial Ecology** - New York : Academic Press ; 1970. 236 p.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR – 14.283: Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico**. Rio de Janeiro, 1999.
- ABOISSA Óleos Vegetais, Disponível em: <<http://www.aboissa.com.br> > Acesso em 4 de Abril de 2006.
- ABREU, P. G.; HIGARASHI, M. M.; JÚNIOR, A. C., **Transesterificação com catálise ácida de resíduos de gordura de frango para produção de biodiesel:resultados preliminares**. In: 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel. Universidade Federal de Lavras e Prefeitura Municipal de Varginha. Anais. Varginha, Minas Gerais, 2005. 1 CD-ROM.
- ACRJ – Associação comercial do Rio de Janeiro. **Produção de biodiesel**. Disponível em: <[http://www.acrj.org.br/noticia.php3?i\\_d\\_article=2624](http://www.acrj.org.br/noticia.php3?i_d_article=2624)> Acessado em 13 de outubro de 2008

- AGÊNCIA Câmara de Notícias, **O que é biocombustível**, Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/internet/agencia/materias.asp?pk=55104>> Acesso em 5 de Março de 2006.
- ALVES DOS SANTOS, M. **Inserção do Biodiesel na Matriz energética brasileira: Aspectos técnicos e ambientais relacionados ao seu uso em motores de combustão**. 2007. 113f. Dissertação (Mestrado em Energia) – Universidade de São Paulo. São Paulo. 2007.
- AMBIENTE Brasil, **Bem vindo ao Ambiente Energia**, Disponível em <<http://www.ambientebrasil.com.br>> Acesso em 5 de Março de 2006.
- AMORIM P. Q. R. **Perspectiva Histórica da Cadeia da Mamona e a Introdução da Produção de Biodiesel no Semi-Árido Brasileiro sob o Enfoque da Teoria dos Custos de Transação**. 2005. 95f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Econômicas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. 2005.
- ANGELIS, D.F. DE; COLABONE, M.A.P. **Bioconversão: do açúcar ao óleo** pg. 41 – 50. In: Simpósio Nacional sobre fontes novas e renováveis de energia. 1º SINERGE. Secretaria de tecnologia. Ministério das Minas e Energia. 1988.
- ANDERSON, J.M.; INGRAM, J.S.I. **Tropical soil biology and fertility. a handbook of methods**. Oxon: CAB International, 1996. 221p.
- BALBA, M.T., Al-Daher, R. and Al-Awadhi, N., **Bioremediation of oil-contaminated soil in Kuwait**. 1998. Environment International, Vol. 24, No. 1/2, pp. 163–173, 1998.
- BARBASSA, A. G. **Análise da área de TUPI**. Disponível em: <<http://www2.petrobras.com.br/ri/port/Comunicados/verComunicados.asp?id=3200&ano=2007>>. Acessado em 15 de outubro 2008.
- BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, Baltimore, v.100, n.1, p.68-70, 1965.
- BERTOLETTI, A. A.; MESSETTI, M. A; SANTOS, A. M.; ANGELIS, D. F.; CHIERICE, G.O.; CLARO NETO, S. **Ação do Poli quilgerm<sup>®</sup> sobre a microbiota da fermentação**

**etanólica no controle de contaminantes.** *In:* Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM, 2007, Curitiba. Anais... Curitiba, Paraná. 2007. 1 CD-ROM.

- BODIESELBR, Biodiesel no Brasil, Disponível em: < <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/brasil/biodiesel-brasil.htm> > Acesso em 9 de maio de 2007.
- BODIESELBR. **Paraná avalia produção de biodiesel através de óleo de frango.** Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/r1-parana-avalia-producao-biodiesel-atraves-oleo-frango-18-04-07.htm>> Acessado em 14 de setembro de 2008.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução a Química de Alimentos.** Campinas: Fundação Cargill, 1985.
- BRANCO, S. M. **Energia e Meio Ambiente,** São Paulo: Moderna, 1990.
- CAMPESTRE Ind. E Com. de Óleos Vegetais Ltda, **Óleo de mamona - especificações técnicas.** Disponível em <[http://www.campestre.com.br/especificacao\\_mamona.shtml](http://www.campestre.com.br/especificacao_mamona.shtml)> Acessado em 4 de abril de 2006.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Norma Técnica. Coleta e preparação de amostras.** Procedimentos, SP. 1984.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Norma técnica L 6.350: Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método respirométrico de Bartha.** São Paulo, 1990, 15p.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Norma técnica L 6.350: Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos.Vol. I. Testes crônicos com Ceriodaphnia.** São Paulo, 1991, 28p.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Norma técnica P4.231: VINHAÇA – CRITÉRIOS E PROCEDIMENTOS PARA APLICAÇÃO NO SOLO AGRÍCOLA.** São Paulo, 2006, 12p.

- CHAILLAN, F.; LE FLECHE, A.; BURY, E.; PHANYAVONG, Y.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. **Identification and biodegradation potencial of tropical aerobic hydrocarbon – degrading microorganisms**. Muséum National d'Histoire Naturelle, USM 505 Ecosystemes et Interactions toxiques, 12 rue Buffon, 75231 Paris Cedex 5, France, 2004.
- CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. **Aplicação industrial do óleo**. In: AZEVEDO, D. M.P.; LIMA, E.F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa, pg 89 - 120, 2001.
- CURTI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura – Ácidos Graxos**. São Paulo: Malone, 2002. 580p.
- D'AVILA, T. **Projeto de estudantes aproveita gordura de frango e porco**. Disponível em:< <http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/biodiesel-produzido-ms-analisado-ipt-01-10-08.htm> > Acessado em 11 de outubro de 2008.
- DIÁRIO DIGITAL. **Biocombustíveis: microalgas são solução ideal**. Disponível em:< <http://energiasrenovaveis.wordpress.com/2008/05/12/biocombustiveis-microalgas-sao-solucao-ideal/>> Acessado em 13 de outubro de 2008.
- DIFCO – **Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology**. 10 ed. Detroit. Difco Laboratories. 1984.
- DOMINGOS, R. N. **Fermentação da farinha do mesocarpo do Coco Babaçu (*Orbignya* sp), pela ação de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus***. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, 2003.
- EID, F. **Progresso Técnico na Agroindústria Sucroalcooleira** Informações Econômicas, SP, v.26, n.5, maio 1996.
- FIDELLI, E. **Microbiological production of lipids**. Curso sobre lipoquímica. 9º Congresso Latino de Microbiologia. 1983. SP.

- FELIZARDO, P. M. G. **Produção de biodiesel a partir de óleos usados de fritura** – Relatório de Estágio submetido ao Departamento de Engenharia Química para obtenção do Grau de Licenciatura em Engenharia Química do Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal, 2003.
- FERNANDES, F. M.; ALCÂNTARA, G. Z. **Biorremediação de solos** – estado da arte. Adesol Produtos Químicos Ltda. São Paulo, 2005. 22p.
- GOLDEMBERG, J. **Energia e desenvolvimento**. Study. av., May/Aug. 1998, vol.12, no.33, p.7-15. ISSN 0103-4014.
- FOGAÇA, M.N. **Verificação do potencial enzimático de biodegradação de substâncias oleaginosas por *Candida viswanathii***. 2007. 60f. Trabalho de Conclusão de curso (Ecologia) Instituto de Biociências, Rio Claro. UNESP. Rio Claro – SP.
- GARCEZ, C.A.G. **Uma análise da política pública do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB)**. 2008, 171p. Dissertação de Mestrado, Área de Energia, Brasília, UNB2008.
- GERPEN, J. V.; KNOTHE, K. **Produção de Biodiesel – Princípios da reação de Transesterificação**. In \_\_\_\_\_. **Manual de Biodiesel**. 1ªed. São Paulo:Edgard Blücher , 2006. p. 29-45.
- GOVERNO DA BAHIA, **O Biodiesel**, Disponível em <<http://www.redebaianadebiocombustiveis.ba.gov.br/index.php?menu=quemsomos>> Acesso em 5 de Março de 2006.
- GOVERNO DO MATO GROSSO. **MT deixa de cobrar ICMS de sebo bovino a produtores de biodiesel**. Disponível em: < [http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/news/article.php?sto\\_ryid=1262](http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/news/article.php?sto_ryid=1262)> Acessado em 13 de setembro de 2008.
- GRADY, C. P. L. **Biodegradation: its measurement and microbiological basis**. **Biotech. Bioeng.**, v. 27, p. 660-674, 1985.

- GUIMARÃES, T. **Biodiesel de sebo bovino** Disponível em: < [http://tecnociencia.inf.br/comunidade/index.php?option=com\\_content&task=view&id=185&Itemid=41](http://tecnociencia.inf.br/comunidade/index.php?option=com_content&task=view&id=185&Itemid=41)> Acessado em 12 de setembro de 2008.
  
- HENCKLEIN, F. A. **Estabilização de landfarming de refinaria de petróleo e aplicabilidade em solos com baixos teores de carbono**. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, 2005.
  
- HENCKLEIN, F. A. **Estabilização de landfarming de refinaria de petróleo e aplicabilidade em solos com baixos teores de carbono**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, 2008.
  
- HENSTRA, A. M.; SPIMA, S.; RIMZEMA, A.; STAMS, A. J. M. **Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel productions**. Current Opinion in Biotechnology vol. 18: pg 200 - 206, 2007.
  
- INAZAKI, T. H., **Biodegradação de efluentes com substâncias persistentes após tratamento eletrolítico**. 2003. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, Rio Claro SP, 2003.
  
- JOÃO, J. J.; OLIVEIRA, D. C. **Aproveitamento do rejeito da gordura de suínos para síntese de biodiesel**. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. Livro de Resumos da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. aceito para ser apresentado, 2007. v. único.
  
- KATAOKA, A. P. A. G., **Biodegradação do resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "Landfarming"**. 2001. 202f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, 2001.

- KIDD, N. **Argentina Produzirá biodiesel a partir de algas marinhas**. Disponível em: <<http://noticias.uol.com.br/economia/ultnot/efe/2007/02/23/ult767u87193.jhtm>> Acessado em 24 de abril de 2007.
- KNOTHE, G.H. 2006. **Research on biodiesel and vegetable oil fuels - Then and now**. 97th American Oil Chemists' Society Annual Meeting and Expo. 2006. p. 66.
- LEAHY, J. G. e CORWELL, R. R. **Microbial Degradation of Hydrocarbons in Environment**. Departamento de Microbiologia da Universidade de Maryland, American Society for Microbiology, 1990.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006, 1202p.
- LIMA, P. C. R. **O biodiesel e a inclusão social**. Consultoria Legislativa Área XII Recursos Minerais, Hídricos e Energéticos Estudo – Março, 2004.
- LIMA MENDONÇA, R.M. **Avaliação do ciclo de vida do carbono na Queima de Biodiesel à base de óleo de soja**. 110f. Dissertação de Mestrado Faculdade de Tecnologia. Universidade de Brasília, Brasília. D.F. 2007.
- 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.; **Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica** Química Nova vol.30 no.3 São Paulo 2007.
- LODDER, S. **The Yeasts – A taxonomic Study**. North Holland. Publish Print Company, 1971.
- MARIANO, A. P., **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) Instituto de Geociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro, 2006.

- MARIANO, A.P., TOMASELLA, R.C., OLIVEIRA, L.M.; ANGELIS, D.F. **Influência do biodiesel na biodegradabilidade da mistura óleo diesel/biodiesel**. In: III Simpósio em Microbiologia Aplicada – Instituto de Biociências - Unesp Rio Claro, SP, 2007. 1 CD-ROM
- MARIANO, A. P.; TOMASELLA, R. C.; OLIVEIRA, L.M.de; CONTIERO, J.; ANGELIS, D. F. **Biodegradability of diesel and biodiesel blends**. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 1323-1328, 2008.
- MAZBRA S/A Indústria e Comércio. **História do Sabão**, disponível em: <<http://www.mazbra.com.br/historia.htm>> Acessado em 9 de Maio de 2007.
- MESSETTI, M. A; SANTOS, A. M.; ANGELIS, D. F.; CHIERICE, G.O.; CLARO NETO, S. **Verificação da atividade do Poli quilgerm<sup>®</sup> sobre dextrana, viscosidade e crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* (B512F)**. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM, 2007, Curitiba, Paraná. 2007. 1 CD-ROM.
- MORAIS, E. B. **Biodegradação de resíduos óleos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas**. 2005. 64f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Paulista, Rio Claro, 2005.
- MUNIYAPPA, R. P.; BRAMMER, S. C.; NOUREDDINI, N. **Improved conversion of plant oils and animal fats into biodiesel and co-product**. Chemical and Biomolecular Engineering Research and Publications – University of Nebraska – Lincoln 1996.
- NETO, M. C. **Sebo é disputado para biodiesel**. Disponível em: <<http://brasilbio.blogspot.com/2007/04/sebo-disputado-para-biodiesel.html>> Acessado em 12 de setembro de 2008.
- OLIVEIRA D. M., ANGELIS, D. F. **Levedura biodegradadora de biodiesel**. In: III Simpósio em Microbiologia Aplicada - Instituto de Biociências - Unesp Rio Claro, SP, 2007. 1 CD-ROM
- OLIVEIRA, D. M.; HENCKEIN, F. A.; SATOW, M. M.; ANGELIS, D. F.; ALMEIDA, A. F.; BERTOLETTI, A. C. D.; MESSETTI, M. A.; GUERRA, R. C.; RONCON, T. J., **Avaliação da biodegradação de biodiesel**. In: 3º Congresso Brasileiro de Plantas

Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel. Universidade Federal de Lavras e Prefeitura Municipal de Varginha. Anais. Varginha, Minas Gerais, 2005. 1 CD-ROM

- OLIVEIRA, N. **Novo campo no pré-sal pode aumentar reservas de petróleo em 30%.** Disponível em: <<http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2008/09/10/materia.2008-09-10.8155139777/view>> Acessado em 15 de outubro de 2008.
- OLIVEIRA, J. R. M. e CARIGNATTO, D. **A pesca da baleia no Brasil:** um estudo de história e meio ambiente – Disponível em: <<http://www.unesp.br/prograd/PDFNE2002/apescadabaleia.pdf>> Acessado em: 9 de Maio de 2008.
- ORTEGA FILHO, S. **O Potencial da Agroindústria Canavieira do Brasil,** FBT\_Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP – Serrana, SP, 2003.
- PETERSON, C.L.; MULLER, G. Biodiesel: Biodegradabilidade, Demandas Química e Biológica de Oxigênio e Toxicidade. In: Knothe, G. et al. **Manual de Biodiesel.** 1ªed. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. p. 159-176.
- PONTES, V. I. M. **Biodegradação de efluente contendo fenol eletrolisado em solo utilizando o método respirométrico de Bartha & Pramer.** 2001. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Paulista, Rio Claro, 2001.
- RATTRAY, J. B. M.; SCHIBECCIA, A.; KIBBEY, D.K. Lipides of Yeast. **Bacteriological Reviews.** 39 (3) p. 197 – 231. 1975.
- RAVEN,P. H.; EVERT,R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001, 906p.
- REVAH S., PÉREZ F., AURIA R. **Generalidades sobre procesos de purificación biológica de airugases.** Biodegradación de compuestos Orgánicos Industriales 1 (1996): 17-22 Instituto de Ingeniería, UNAM México, D.F.
- RIZZO, A. C.L., MILLIOLI, V. S.; **BIORREMEDIAÇÃO EX-SITU COM APLICAÇÃO DE BIOSSURFATANTE.** CT2003-094-00 – Comunicação técnica ao 3º

Congresso Nacional de Iniciação Científica e 1º Congresso Internacional de Iniciação Científica, CONIC 2003, 7-8 São Paulo – SP, V. 4 - p. 1674. Nov. 2003.

- ROCHA, D. Veículo já andam com combustível de sebo Bovino. Disponível em: <<http://www.ambienteemfoco.com.br/?p=4419>> Acessado em 17 de setembro de 2008.
- ROCHA, D. **Sebo bovino será fundamental para exportações de biodiesel, diz secretário.** Disponível em: <<http://www.iica.int/Esp/regiones/sur/argentina/Lists/Noticias/DispForm.aspx?ID=721>> Acessado em 17 de setembro de 2008.
- SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S., **Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation.** Department of Earth and Environmental Science, University of Texas San Antonio, 6900 North Loop, 1604 West, San Antonio, TX 78249-0663, USA, Pages 187-195, 2005.
- SATOW, M. M. "**Screening**" de fungos filamentosos degradados de hidrocarbonetos complexos. 54p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade Paulista, Rio Claro, 2005.
- SCHUCHARDT, U.; LOPES, O.C. **Catalisadores orgânicos para obtenção de ésteres metílicos e etílicos de óleos vegetais, sua ancoragem em polímeros e testes em reator contínuo.** In: Simpósio Nacional sobre fontes novas e renováveis de energia. 1º SINERGE. Secretaria de tecnologia. Ministério das Minas e Energia. 1988. Pg. 51 – 55.
- SCHUSTER, I., **Soja e Saúde,** Disponível em: <[http://www.coodetec.com.br/sojasaude/acidos\\_graxos.htm](http://www.coodetec.com.br/sojasaude/acidos_graxos.htm)> Acesso em 27 de Abril de 2006.
- SILVA, E. R., **Álcool e Gasolina – Combustíveis do Brasil,** São Paulo: Scipione, 1997.
- SCIARRETTA, T., **Petróleo: o combustível da guerra no Oriente Médio – 2003,** disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/especial/2003/guerranoiraque/0019.shtml>> Acesso em 22 de Março de 2006.

- SERPA, E. **Alga limpará carvão em Pecém.** Disponível em: < [http://www.pesca.sp.gov.br/noticia.php?id\\_not=2347](http://www.pesca.sp.gov.br/noticia.php?id_not=2347)> Acessado em 13 de outubro de 2008.
- SPIVEY J. J.; EGEDEBI A. **Heterogeneous synthesis of ethanol from biomass derived syngas.** Chem Soc.Rev. 36, p.1514-1528 ,2007.
- SONI, P.; PRASAD, G.S.; BANERJEE, U.C. **Optimization of physicochemical parameters for enhancement of carbonyl reductase production by *Candida viswanathii*.** Bioprocess Biosyst Eng. 29:149-156, Punjab, Índia, 2006.
- SUÍNO.com. **Saiba um pouco mais sobre a origem da soja.** Disponível em: <[http://www.suino.com.br/nutricao/noticia.asp?pf\\_id=11353&dept\\_id=6](http://www.suino.com.br/nutricao/noticia.asp?pf_id=11353&dept_id=6)>. Acesso em 18 de Abril de 2006.
- TEIXEIRA, C. M., - **Microalga como matéria prima para produção de biodiesel.** In: Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. 1º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. Rede Baiana de Biocombustíveis. 2006. Pg 91 – 96.
- Biodiesel em ascensão – disponível em <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=3200&bd=1&pg=3&lg>> Acessado em 9 de maio de 2007.
- TEIXEIRA,C. M. L. L.; BARRETO, A. J. B., MENDES, D., KUNIGAMI,C. N. **Produção laboratorial de biodiesel de óleo de vísceras de frango e caracterização.** In: 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel. Universidade Federal de Lavras e Prefeitura Municipal de Varginha. Anais. Varginha, Minas Gerais, 2005. 1 CD-ROM
- VAL, V. M. F. A. **Reunião Regional de Manaus: Efeito do petróleo sobre peixes da Amazônia- 2005,** Disponível em: < <http://www.jornaldaciencia.org.br/Detail.jsp?id=31784>> Acesso em 4 de Abril de 2006.
- VEDANA, J. C. S. **Tudo Sobre Biodiesel,** disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/biodiesel.htm>> Acesso em Acesso em 5 de Março de 2006.
- WENDT, H; GÖTZ, M.; LINARDI, M. **Tecnologia de células a combustível** Instituto de tecnologia química da Alemanha e Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN/CNEN-SP, 1999.